

Proyecto Fin de Carrera

Producción de doblehaploides en cebada.
Estudios moleculares asociados al albinismo.

Autor/es

Sandra Allué Durango

Director/es y/o ponente

M^a Pilar Vallés Brau (EEAD-CSIC)

Celia Montaner Otín (Unizar)

Título a defender: Ingeniería técnica Agrícola.

Trabajo realizado en Aula Dei (EEAA-CSIC).

Escuela Politécnica Superior de Huesca

Septiembre 2014

RESUMEN

Las plantas doblehaploides (DHs) en programas de mejora tiene como ventaja fundamental el permitir acortar el tiempo necesario para la obtención de nuevas variedades. En la actualidad, el método embriogénesis de la microspora mediante el cultivo de anteras o microsporas aisladas es la técnica de producción de DHs con mayor potencialidad. Aunque la cebada se considera una especie modelo en este método, los altos porcentajes de albinismo entre las plantas regeneradas es una limitación para el desarrollo de la técnica.

Este Proyecto Fin de Carrera tiene como objetivo general, determinar los mecanismos moleculares asociados al albinismo en las fases iniciales de la embriogénesis de la microspora en cebada, a través del análisis de la expresión de genes asociados funcionalmente con los plástidos. Los estudios se realizaron en la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD) (CSIC).

Inicialmente se comparó la expresión génica de 67 genes asociados a los plástidos, en hojas albinas y verdes de plantas regeneradas por cultivo de anteras, de tres variedades de cebada que presentaban porcentajes de albinismo muy altos. De este análisis se seleccionaron 12 genes por presentar diferencias consistentes entre las hojas albinas y verdes y 3 genes que permitían diferenciar entre variedades.

Se estudiaron los perfiles de expresión de los genes seleccionados en las primeras fases del cultivo de anteras, en dos líneas DHs de una población especialmente diseñada para el estudio genético del albinismo en cebada y en tres variedades con distinto porcentaje de regeneración de plantas albinas.

Los resultados obtenidos parecen indicar que, al inicio de la embriogénesis de la microspora, las estructuras que regeneran plantas albinas expresan más tarde los genes asociados con el desarrollo de plástidos y la síntesis de almidón. Sin embargo, expresan antes, genes relacionados con la edición de RNA y traducción.

Estos resultados parecen indicar que en los materiales albinos se produce una descoordinación entre distintos mecanismos moleculares relacionados con los plástidos y que esta descoordinación podría ser la causante del albinismo en el cultivo de anteras de cebada.

SUMMARY

The doubled haploid (DHs) plants in breeding programs has the great advantage that shortens the time required to develop new varieties. Currently, microspore embryogenesis through anther or isolated microspore culture is the most promising method for DHs production. Although barley is considered a model species in this method, the high level of albinism among the regenerated plants is a constraint to the full development of the technique.

The general objective of this Final Year Project is to define the molecular mechanisms associated with albinism in early stages of barley microspore embryogenesis, by expression analysis of genes functionally associated with plastids. The studies were conducted at the Experimental Station of Aula Dei (EEAD) (CSIC).

Initially, gene expression of 67 genes was compared in albino and green leaves of plants obtained by anther culture in three barley varieties exhibiting high rates of albinism. From this analysis, 12 genes that showed consistent differences between albino and green leaves and 3 genes that could differentiate varieties were selected.

Expression profiles of selected genes in early stages of anther culture in two DHs lines specially designed for a genetic study of albinism and three varieties with different percentage of albinism were studied.

The results suggest that in the earliest stages of microspore embryogenesis, albino structures begin later the expression of genes associated with plastid development and starch synthesis. However they expressed genes associated with RNA editing and translation earlier than green structures

These results also suggest that in the albino structures an uncoordinated among different molecular mechanisms associated with plastids occurs, and that this lack of coordination may be the cause of albinism in barley anther culture.

ÍNDICES

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Aspectos generales de la cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	2
1.2.- Importancia de las plantas doblehaploides (DHs) en mejora.....	4
1.2.1.- Métodos de producción de plantas DHs.....	5
1.3.- Producción de plantas DHs mediante embriogénesis de la microspora.....	7
1.4.- Factores que afectan a la embriogénesis de la microspora.....	8
1.4.1.- Genotipo.....	8
1.4.2.- Estado fisiológico de las plantas donantes.....	9
1.4.3.- Estado de desarrollo de las microsporas.....	9
1.4.4.- Pretratamiento de estrés.....	9
1.4.5.- Composición de los medios de cultivo.....	10
1.5.- Albinismo.....	10
1.5.1.- Aspectos generales de los cloroplastos.....	10
1.5.2.- Cambios morfológicos en los plástidos de las plantas albinas.....	11
1.5.3.- Genoma del plástido.....	12
1.5.4.- Genoma nuclear.....	13
1.5.5.- Factores fisiológicos.....	14
2.- OBJETIVOS.....	15
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1.- Material vegetal.....	18
3.1.1.- Genotipos utilizados.....	18
3.2.- Genes analizados.....	19
3.3.- Estudios de expresión génica.....	21
3.3.1.- Recogida de muestras.....	21
3.3.2.- Aislamiento de RNA.....	22
3.3.2.1.- Homogeneización de las muestras.....	22
3.3.2.2.- Extracción de RNA mediante Trizol.....	23
3.3.3.- Síntesis de cDNA.....	27
3.3.3.1.- Tratamiento con DNAsa I.....	27
3.3.3.2.- Limpieza del RNA- RNeasy MinElute Cleanup Kit.....	27
3.3.3.3.- Síntesis de la cadena de cDNA.....	28

3.3.4.- Amplificación de genes mediante PCR-Semicuantitativa.	29
3.3.4.1.- Diseños de cebadores.....	29
3.3.4.2.- PCR-Semicuantitativa.	33
3.3.5.- Amplificación de genes mediante PCR-Cuantitativa o en tiempo real.	37
3.3.5.1.- Diseño de Cebadores.....	37
3.3.5.2.- PCR-Cuantitativa.	38
 4.- RESULTADOS	43
4.1.- Caracterización de los genes seleccionados para este estudio.....	44
4.2.- Comparación de la expresión génica entre hojas albinas y verdes de plantas obtenidas en cultivo de anteras.....	48
4.2.1.- Comparación de los perfiles de expresión génica en cultivo de anteras de las líneas DH6148 y DH6183.....	51
4.2.2.- Comparación de los perfiles de expresión génica en cultivo de anteras de las variedades Orelie, Volley y Riviera.....	56
4.3.- Análisis de la expresión de los genes candidatos mediante PCR- Cuantitativa.	61
4.3.1.- Establecimiento de las condiciones para PCR- Cuantitativa.	62
4.3.2.- Determinación de los niveles de expresión de los genes <i>RHB1A</i> y <i>Hv- ALB5</i> en las primeras fases de cultivo de anteras.....	65
 5.- DISCUSIÓN	70
 6.- CONCLUSIONES	83
 7.- BIBLIOGRAFÍA	86
 8.- ANEXO I	98
 9.- ANEXO II	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución de la superficie (Mha) y de la producción (Mt) de cereales por cultivos en España. Campaña 2012/2013. Fuente: Secretaría General Técnica del MAGRAMA (Avances de superficies y producciones de cultivos).	2
Figura 2.- Morfología de una espiguilla (imagen de la izquierda) y de una flor de cebada. Adaptada de http://www.uc.cl/	4
Figura 3.- Métodos de producción de plantas haploides (adaptada de Forster y col. 2007): embriogénesis de la microspora o androgénesis a partir de anteras o microsporas cultivadas <i>in vitro</i> ; ginogénesis a partir de óvulos u ovarios cultivados <i>in vitro</i> ; cruzamiento interespecífico o intergenético por fertilización de un óvulo con el polen de otras especies o por partenogénesis mediante la fertilización con polen irradiado.....	6
Figura 4.- Estructura de un cloroplasto. Adaptada de http://www.uc.cl/	11
Figura 5.- Pasos seguidos para los análisis de expresión génica.....	21
Figura 6.- Recogida de muestras: a) Recogida de anteras en cultivo; b) Congelación de las muestras con N ₂ líquido y c) Muestra congelada en N ₂ líquido en un tubo Eppendorf de 1,5ml.	22
Figura 7.- Homogeneización de muestras mediante el Molino Mezclador MM 301 RETSCH: a) Kit criogénico con bloques criogénicos y unas pinzas para manipular los bloques en N ₂ líquido; b) Tubos Eppendorf de 1,5ml con las muestras y bolitas de acero para facilitar la homogeneización; c) Tubos con las muestras dentro de los bloques criogénicos en N ₂ líquido; d) Acoplado de los bloques criogénicos al molino y e) Agitación de los bloques en el molino a 1800rpm durante 2min.....	23
Figura 8.- Extracción de RNA mediante Trizol®: a) Tratamiento de las muestras con Trizol® en la campana de extracción de gases; b) Incubación de las muestras en bloque seco durante 5min a 60°C y c) Separación de la fase superior hidrosoluble que contiene el RNA.....	24

Figura 9.- Resultado de la separación de fases en la extracción de RNA mediante Trizol® (Hernández y col. 1994)	25
Figura 10.- El equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) se empleó para cuantificar el RNA en cada muestra.....	26
Figura 11.- Comprobación del estado de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa. Visualización mediante bromuro de etidio y luz ultravioleta.....	27
Figura 12.- Limpieza del RNA con el RNeasy MinElute Cleanup Kit: a) RNeasy MinElute Cleanup Kit (50) de Quiagen; b) Columna que contiene una membrana de sílice para retener el RNA; c) Aplicación de las muestras a las columnas y d) Centrifugación de las muestras para que pasen a través de la membrana de la columna.....	28
Figura 13.- Condiciones y equipamiento para la técnica PCR Semicuantitativa; a) Cabina de flujo laminar vertical para evitar contaminaciones de DNA externo; b) Material estéril utilizado; c) Tiras de 8 tubos de 0,2ml donde se desarrollan las reacciones y d) El termociclador utilizado para la amplificación de DNA.....	35
Figura 14.- Representación de las 3 etapas de un ciclo de amplificación. Fuente: www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/	36
Figura 15.- Visualización de los productos de amplificación en geles de agarosa: a) Mezcla de la muestra con el buffer SB en un trozo de papel Parafilm; b) Introducción de 15µl de la mezcla, en los pocillos del gel de agarosa; c) La electroforesis se efectúa a 80V durante 1h y 20min y d) Gel-Doc de Bio-Rad con luz ultravioleta, para la visualización del producto amplificado.	37
Figura 16.- Gráfica de amplificación en PCR-Cuantitativa. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada y el eje horizontal el número de ciclos. La Baseline o línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia y solo se detecta la fluorescencia basal. Threshold es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia y el corte entre el Threshold y la curva de amplificación determina el C _T o	

ciclo umbral que se emplea para la cuantificación de la expresión génica. Fuente: Applied Biosystems..... 39

Figura 17.- Procedimiento de la técnica PCR-Cuantitativa: a) Placas específicas para PCR-Cuantitativa y b) Termociclador de PCR-Cuantitativa..... 40

Figura 18.- Análisis de expresión de los 15 genes seleccionados, mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*. 50

Figura 19.- Perfiles de expresión de los 5 genes relacionados con la fotosíntesis, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 52

Figura 20.- Perfiles de expresión de los genes relacionados con la respuesta al estrés, analizados mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 53

Figura 21.- Perfiles de expresión de los 7 genes relacionados con la expresión génica en plástidos, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos

anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 54

Figura 22.- Perfil de expresión del gen *Hv-ALB5* de función desconocida, analizada mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 55

Figura 23.- Perfiles de expresión de los 5 genes relacionados con la fotosíntesis, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 57

Figura 24.- Perfiles de expresión de los 2 genes relacionados respuesta al estrés, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 58

Figura 25.- Perfiles de expresión de los 7 genes relacionados con la expresión génica en plástidos, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras

de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 60

Figura 26.- Perfiles de expresión del gen *Hv-ALB5* de función desconocida, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*. 61

Figura 27.- Rectas de regresión de los pares de cebadores calculadas a partir de los valores de C_T obtenidos en las amplificaciones de las diluciones de cDNA (1, 1:2, 1:4, 1:6). 64

Figura 28.- Representación gráfica de los valores de expresión del gen *RHB1A* obtenidos mediante PCR- Cuantitativa, utilizando como control el gen *GAPDH*. Las muestras correspondían a anteras a los 0 y 4 días de tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de dos replicas biológicas de las líneas DH6148 y DH6183. 68

Figura 29.- Representación gráfica de los valores de expresión del gen *Hv-ALB5* obtenidos mediante PCR- Cuantitativa utilizando como control el gen *GAPDH*. Las muestras correspondían a anteras a los 0 y 4 días de tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de dos replicas biológicas de las líneas DH6148 y DH6183. 69

Figura 30.- Regeneración de plántulas albinas y verdes en cultivo de anteras de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. 73

Figura 31.- Comparación de los perfiles de expresión de los 7 genes que presentaban diferencias de expresión entre materiales que generan altos y bajos porcentajes de albinismo en cultivo de anteras. Se incluyen los resultados de: muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades Vanessa, Siberia y Static; anteras a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo

de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183 y anteras a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. Gen constitutivo *Hv-Actin2*..... 76

Figura 32.- Representación cronológica de la expresión de los genes *NOS1*, *RLUB*, *DAG* y *TAB*, en cultivo de anteras a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183..... 81

Figura 33.- Plantas de cebada en cámara de crecimiento a 18-21°C y fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad..... 99

Figura 34.- Producción de plantas doblehaploides en cebada mediante el cultivo de anteras: a) Anteras sometidas a un tratamiento de estrés en un medio con manitol; b) Anteras en la fase de inducción, donde las microsporas empiezan a dividirse; c) Formación de estructura embriogénicas; d) Embriones bien diferenciados; e) Plántulas verdes y albinas en el medio de regeneración; f) Plántulas verdes en una caja Magenta que contiene un medio para el desarrollo del sistema radicular; g) Trasplante a tierra y aclimatación de las plantas y h) Plantas en invernadero para obtención de semillas. 101

Figura 35.- Análisis de expresión de 26 de los genes de la colección EM mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hoja albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*..... 105

Figura 36.- Análisis de expresión de los 15 genes de la colección QTL-Alb mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hoja albina (A) y hoja verde (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*. 106

Figura 37.- Análisis de expresión de los 18 genes M-Alb mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hoja albina (A) y hoja verde (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*..... 107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Análisis por comunidades autónomas en 2011 de superficie (ha) y producción (t) según los tipos de cebada. Fuente: MAGRAMA. Anuario de estadística agraria de España 2012..... 3

Tabla 2.- Cambios en la estructura de los plástidos durante el proceso embriogénesis de la microspora. Adaptación de Makowska y Oleszczuk 2013. Las flechas indican la tendencia relativa a la columna anterior..... 12

Tabla 3.- Características de la respuesta del cultivo de anteras de las líneas DH6148 y DH6183. En la tabla se representa: (nAR) número de anteras que responden a la inducción/100 anteras inoculadas; (nDIV) número de divisiones/100 anteras inoculadas; (nEMB) número de embriones/100 anteras inoculadas; (%EMB) $(nEMB/nDIV) \times 100$; (nPV) número de plantas verdes/100 anteras inoculadas; (nPA) número de plantas albinas/100 anteras inoculadas y (%REG) $(nPV+nPA/nEMB) \times 100$ y (%ALB) $(nPA/(nPV+nPA)) \times 100$ 18

Tabla 4.- Características de la respuesta del cultivo de anteras de las variedades de importancia agronómica: Vanessa, Siberia, Static, Orelie, Volley y Riviera. En la tabla se representa: (nAR) número de anteras que responden a la inducción/100 anteras inoculadas; (nDIV) número de divisiones/100 anteras inoculadas; (nEMB) número de embriones/100 anteras inoculadas; (%EMB) $(nEMB/nDIV) \times 100$; (nPV) número de plantas verdes/100 anteras inoculadas; (nPA) número de plantas albinas/100 anteras inoculadas; (%REG) $(nPV+nPA/nEMB) \times 100$ y (%ALB) $(nPA/(nPV+nPA)) \times 100$ 19

Tabla 5.- Colecciones de genes seleccionadas para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a albinismo: (EM) seleccionados en embriogénesis de la microspora; (QTL-Alb) mapados en regiones cromosómicas asociadas a albinismo y (M-Alb) asociados a mutantes albinos de cebada. El código para nombrar los genes es el correspondiente al “Barley1 GeneChip” (Affymetrix). 20

Tabla 6.- Composición del gel de agarosa y de la muestra, utilizados para la electroforesis de RNA..... 26

Tabla 7.- Composición de la mezcla de la reacción para la síntesis de cDNA.	29
Tabla 8.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes a los genes de la colección EM.	31
Tabla 9.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes a los genes de la colección QTL-Alb.	32
Tabla 10.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes a los genes de la colección M-Alb.	33
Tabla 11.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes al gen constitutivo <i>ACTINA</i> de cebada (<i>Hv-Actin2</i>).	33
Tabla 12.- Composición de la mezcla de la reacción para PCR- Semicuantitativa.	34
Tabla 13.- Programa de amplificación para PCR-Semicuantitativa.	35
Tabla 14.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Cuantitativa. Se incluye las secuencias correspondientes al gen constitutivo GAPDH, que se empleó como gen control.	38
Tabla 15.- Composición de la reacción para detectar dímeros entre cebadores.	40
Tabla 16.- Composición de la reacción para determinar la eficiencia de los cebadores.	41
Tabla 17.- Homologías de secuencias de los genes de la colección EM, mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74. Se presenta la homología con mayor valor de similitud (“e- value”) de las tres analizadas (UniProt (general), MSU (arroz), TAIR (<i>Arabidopsis</i>)), así como el acrónimo correspondiente.	45
Tabla 18.- Homologías de secuencias de los genes de la colección QTLs, mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74. Se presenta la homología con mayor valor de	

similitud (“e- value”) de las tres analizadas (UniProt (general), MSU (arroz), TAIR (*Arabidopsis*)), así como el acrónimo correspondiente..... 46

Tabla 19.- Homologías de secuencias de los genes de la colección M-Alb, mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74. Se presenta la homología con mayor valor de similitud (“e- value”) de las tres analizadas (UniProt (general), MSU (arroz), TAIR (*Arabidopsis*)), así como el acrónimo correspondiente..... 47

Tabla 20.- Homologías de secuencias de los 15 genes seleccionados como genes candidatos para posteriores estudios, con sus acrónimos correspondientes y agrupados por su función general..... 49

Tabla 21.- Genes que muestran diferencias de expresión entre materiales verdes y albinos en cultivo de anteras..... 62

Tabla 22.- Valores de C_T obtenidos en las amplificaciones mediante PCR- Cuantitativa, con los cebadores diseñados para los genes seleccionados. Se utilizó diluciones de cDNA de 1, 1:2, 1:4 y 1:6 de anteras a los 16 días de cultivo (16dc) de la línea DH6183 para el gen *Hv-ALB5*. Se hicieron las mismas diluciones de anteras a los 8 días de cultivo (8dc) de la línea DH 6148 para el resto de genes. 63

Tabla 23.- Cálculo de las eficiencias de los cebadores, tras hallar la recta de regresión..... 65

Tabla 24.- Cuantificación de la expresión del gen RHB1A mediante PCR- Cuantitativa utilizando como control el gen GAPDH, en muestras de anteras a los 0 y 4 días después del tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc), de dos replicas biológicas (A y B) y dos replicas técnicas (1 y 2) de las líneas DH6148 y DH6183..... 66

Tabla 25.- Cuantificación de la expresión del gen *Hv-ALB5* mediante PCR- Cuantitativa utilizando como control el gen *GAPDH*, en muestras de anteras a los 0 y 4 días después del tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de dos replicas biológicas (A y B) y dos replicas técnicas (1 y 2) de las líneas DH6148 y DH6183..... 67

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

bp: pares de bases

BrEt: Bromuro de etidio

°C: grado centígrado

cDNA: DNA copia

cm: centímetros

CSIC: Consejo Superior de
Investigaciones Científicas

dc: días de cultivo

DEPC: dietilpirocarbonato.

DH: doblehaploide

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAsa: desoxirribonucleasa

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

dp: días de pretratamiento

e-value: “Expectation value”

EEAA: Estación Experimental de Aula
Dei

FAO: Food and Agriculture Organization

FAOSTAT: FAO Statistical database

FHGI: medio de inducción de
embriogénesis de cebada

FHGR: medio de regeneración de
cebada.

h: horas

ha: hectáreas

H₂O: agua

Kg: Kilogramo

Kpb: kilopares de bases

M: molar

mg: miligramo

Mha: miles de hectareas

min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MSU: “Rice Genome Annotation
Project Database and Resource”

Mt: miles de toneladas

N₂: nitrógeno líquido

PCR: reacción en cadena de la
polimerasa

QTLs: Quantitative Trait Loci

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcriptasa reversa

RT-PCR: reacción en cadena de la
polimerasa en tiempo real

s: segundo

t: tonelada

T^a: temperatura

TAIR: “*Arabidopsis* Information
Resource

TAQ: “*Thermus aquaticus* polymerase”

TET: medio de tratamiento de cebada

Tm: temperatura fusión

V: voltios

W: waltios

μE: microEinstein

μg: microgramo

μl: microlitro

μM: micromolar

μm: micra

Ø: diámetro

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Aspectos generales de la cebada (*Hordeum vulgare* L.).

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es un cereal que tiene gran importancia ya que ocupa el cuarto lugar a escala mundial en cuanto a superficie cultivada y a producción después del trigo, arroz y maíz. Su cultivo, como ocurre con otros cereales, se distribuye por prácticamente todo el mundo, siendo Rusia el país con mayor superficie seguido de Ucrania, Australia, Turquía y España (FAOSTATS 2012).

En España, la cebada es el cereal más cultivado y el de mayor producción (Figura 1), seguido del trigo y del maíz.

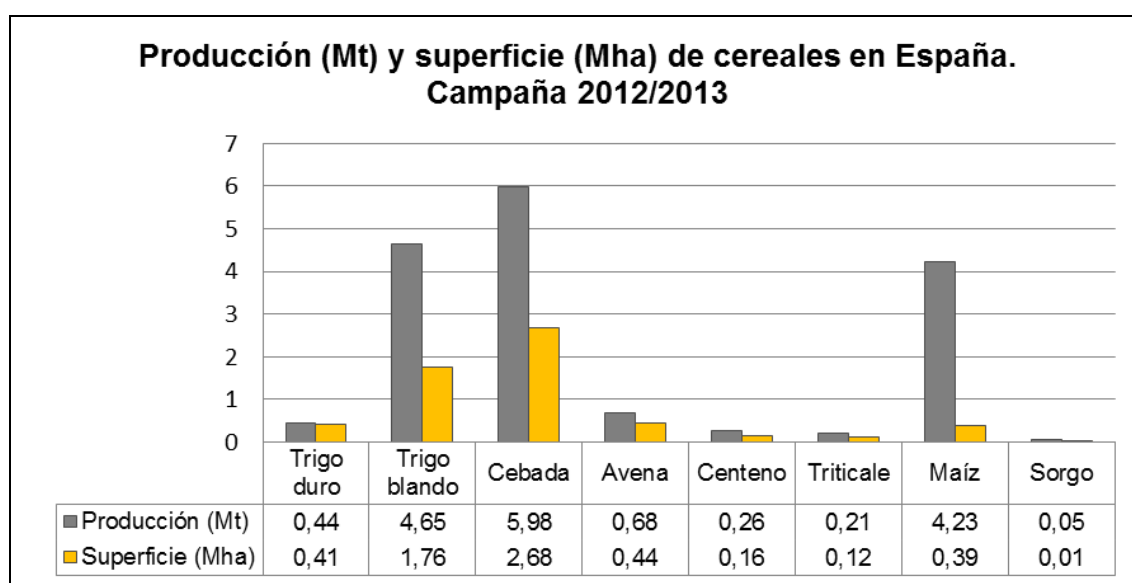


Figura 1.- Distribución de la superficie (Mha) y de la producción (Mt) de cereales por cultivos en España. Campaña 2012/2013. Fuente: Secretaría General Técnica del MAGRAMA (Avances de superficies y producciones de cultivos).

La cebada se produce en prácticamente toda la geografía nacional, destacando por su importancia las comunidades de Castilla y León, Castilla-La Mancha y Aragón (Tabla 1).

Tabla 1.- Análisis por comunidades autónomas en 2011 de superficie (ha) y producción (t) según los tipos de cebada. Fuente: MAGRAMA. Anuario de estadística agraria de España 2012.

Comunidades Autónomas	Cebada de 2 carreras		Cebada de 6 carreras	
	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
Galicia	238	467	–	–
Cantabria	–	–	281	368
País Vasco	14.407	82.840	–	–
Navarra	87.968	–	–	327.248
La Rioja	13.762	52.409	–	–
Aragón	376.452	1.038.759	40.624	133.667
Cataluña	150.417	482.304	14.835	42.912
Baleares	7.073	18.426	10.610	27.639
Castilla y León	851.547	2.850.592	88.812	270.601
Madrid	38.954	133.587	451	1.108
Castilla– La Mancha	630.781	1.881.566	172.645	501.541
Comunidad Valenciana	12.566	30.589	3.242	9.994
Región de Murcia	7.377	9.150	19.885	22.185
Extremadura	52.711	100.967	1.852	2.746
Andalucía	45.723	105.402	57.384	159.924
Canarias	–	–	82	82

La cebada es una planta monocotiledónea, fundamentalmente autógama, que pertenece a la familia de las *Poaceae* (*Gramineae*). La mayoría de las especies de *Hordeum* son diploides ($2n=2x=14$), aunque algunas son tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$). Los cromosomas de cada genomio se clasifican en 7 grupos de homeología.

La parte aérea de este cereal está compuesta por tallos que parten del nudo de ahijamiento. Cada tallo está formado por una serie de nudos, separados por entrenudos, de donde nacen las hojas. Las hojas constan de dos partes: el limbo y la vaina que envuelven al tallo. La inflorescencia de la cebada es una espiga compuesta por un eje o raquis, donde se insertan las espiguillas en posición alterna. Cada espiguilla está envuelta en dos brácteas o glumas (Figura 2). Dentro de ella, hay una flor cubierta por dos glumillas, inferior y superior, denominadas lema y pálea. Cada flor tiene tres estambres, un pistilo compuesto por un ovario y un estigma bifido (Figura 2).

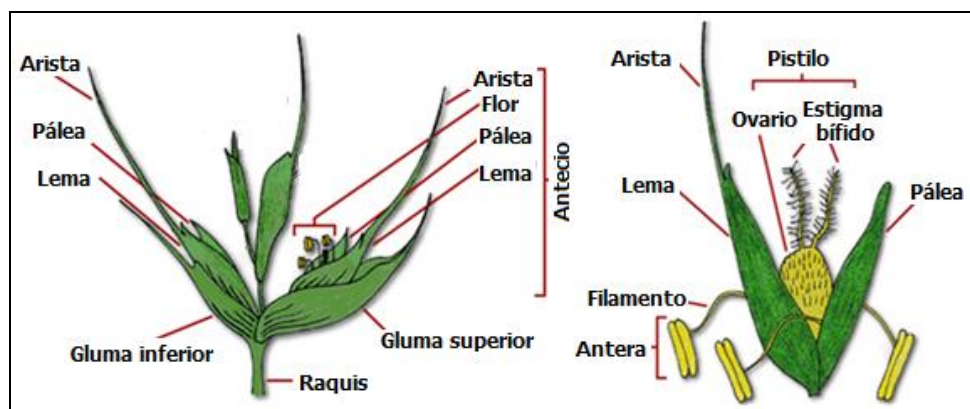


Figura 2.- Morfología de una espiguilla (imagen de la izquierda) y de una flor de cebada. Adaptada de <http://www.uc.cl/>.

Si todas las espiguillas son fértiles, la cebada se denomina de seis carreras (6C), si solo las espiguillas centrales son fértiles, la cebada se denomina de dos carreras (2C).

Esta gramínea se cultiva en una gran variedad de ambientes, más que ningún otro cereal, porque se adapta bien a las condiciones marginales de clima y suelo.

La mayoría de la cebada que se produce se emplea para alimentación de ganado bovino, porcino y aves de corral. También se utiliza para el malteado en la elaboración de cerveza y otras bebidas alcohólicas. Recientemente ha aumentado su uso en alimentación humana. Además del grano como producto principal, se aprovecha también la paja como fuente de celulosa en ración para los rumiantes y para cama del ganado.

1.2.- Importancia de las plantas doblehaploides (DHs) en mejora.

La producción y calidad del grano en cebada ha ido mejorando en las últimas décadas por el desarrollo de programas de mejora que han aplicado métodos de mejora tradicional, como el método masal, genealógico o por retrocruzamientos (Sánchez-Monge 1974). La introducción de las técnicas biotecnológicas y los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas herramientas en la mejora vegetal, entre éstas, la producción de doblehaploides (DHs).

Las plantas haploides se definen como esporofitos cuya dotación cromosómica es la gamética (Kasha 2005). Estas plantas haploides son estériles y para conseguir la fertilidad es necesaria una duplicación cromosómica. Así, las plantas DHs son aquellas que se obtienen mediante la duplicación cromosómica, espontánea o mediante inducción química, de las plantas haploides. Por lo tanto, son plantas totalmente homocigóticas en todos los loci y completamente fértiles.

Mientras que mediante los métodos tradicionales de mejora se consigue la homocigosis tras sucesivas generaciones de autofecundación, en la producción de plantas DHs se alcanza la homocigosis en solo una generación (Kasha 2005). Por tanto, este método permite acortar el tiempo necesario para la obtención de nuevas variedades en unos 4 a 6 años (Snape y col. 1986, Thomas y col. 2003).

La combinación de la producción de DHs con la selección asistida por marcadores moleculares constituye una herramienta muy poderosa para la obtención de nuevas variedades. Una población DH a partir de una F1 de un cruzamiento es también un material ideal para el mapado genético, ya que ha sufrido solo una ronda de recombinación y por lo tanto muestra una expresión máxima de las relaciones de ligamento (Forster y Powell 1997). Los DHs son también especialmente útiles para estudios genéticos, análisis de QTLs ("Quantitative Trait Loci") y en combinación con mutagénesis y transformación (Szarejko 2003, Forster y Thomas 2003, Devaux y Pickering 2005, Forster y Thomas 2005).

1.2.1.- Métodos de producción de plantas DHs.

Aunque hay más de cien especies vegetales que son capaces de producir haploides de forma espontánea, estos se producen en una frecuencia muy baja (0,001 -0,01%) (Palmer y Keller 2005) como para que puedan usarse en los programas de mejora. Por ello, se han puesto a punto diversos métodos para la producción de forma más eficiente de haploides y tras una duplicación cromosómica se obtengan plantas DHs. En la figura 3 se muestra los métodos para la producción de haploides más efectivos en la actualidad.

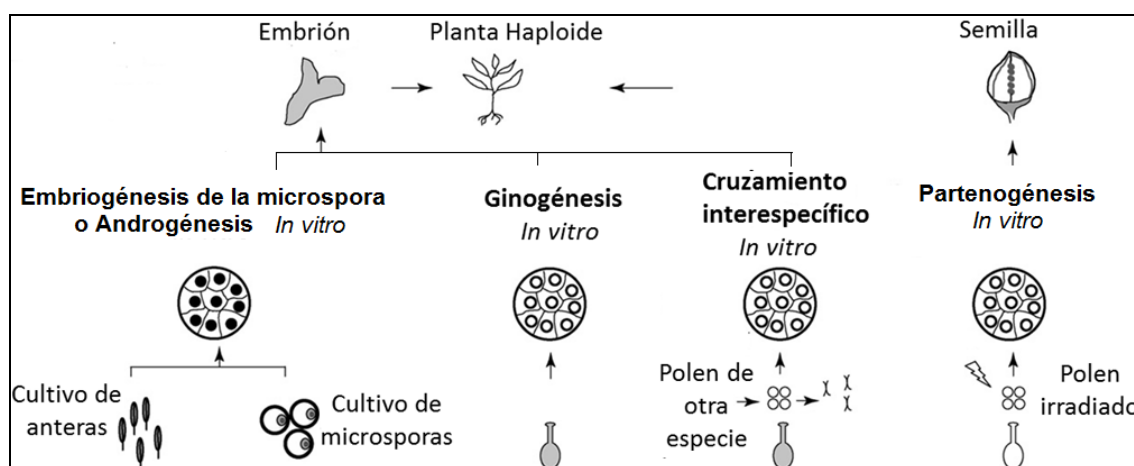


Figura 3.- Métodos de producción de plantas haploides (adaptada de Forster y col. 2007): embriogénesis de la microspora o androgénesis a partir de anteras o microsporas cultivadas *in vitro*; ginogénesis a partir de óvulos u ovarios cultivados *in vitro*; cruzamiento interespecífico o intergenético por fertilización de un óvulo con el polen de otras especies o por partenogénesis mediante la fertilización con polen irradiado.

El método de embriogénesis de la microspora o androgénesis se basa en la capacidad que tienen las microsporas (espora masculina que se divide por mitosis para producir un grano de polen, gameto masculino), de cambiar su patrón de desarrollo de la vía gametofítica a la vía esporofítica, para dar lugar a un embrión. Esto se logra mediante el cultivo de anteras o de microsporas aisladas (Maluszynski y col. 2003a).

La ginogénesis *in vitro* se lleva a cabo mediante el cultivo de ovarios o flores completas. Los embriones se forman a partir de alguna de las células haploides del saco embrionario. En la actualidad es la técnica menos empleada debido a su baja eficiencia, aunque se pueden obtener plantas DHs en especies que no responden a tratamientos más eficientes, como en *Allium cepa* L.

En el método cruzamiento interespecífico o intergenético, tras la fertilización y durante la embriogénesis temprana, una dotación cromosómica de un parental es eliminada, generalmente del polinizador (Jensen 1977, Mujeeb- Kazi y Riera- Lizarazu 1996). En el caso de la cebada, el cruzamiento interespecífico se realiza con *Hordeum bulbosum* L., un pariente silvestre (Maluszynski y col. 2003a).

La partenogénesis fue uno de los primeros métodos utilizados y está basado en la formación de un embrión a partir de la ovocélula sin la intervención del gameto

masculino. Este método puede ser inducido artificialmente, mediante polen irradiado o inactivo, por tratamientos físicos o químicos. Actualmente se utiliza en especies como *Cucumis melo* L. y *Cucumis sativus* L. (Claveria y col. 2005).

En cebada los métodos de producción más utilizados son el cruzamiento interespecífico o intergenético y la embriogénesis de la microspora. Ambos han dado lugar al registro de un elevado número de nuevas variedades (Thomas y col. 2003).

1.3.- Producción de plantas DHs mediante embriogénesis de la microspora.

La embriogénesis de la microspora o androgénesis es el proceso mediante el cual una microspora, tras un tratamiento de estrés, es capaz de cambiar su patrón de desarrollo de la vía gametofítica a la vía esporofítica, formando un embrión haploide que da lugar, después de la duplicación, a una planta completa homocigótica y fértil. La embriogénesis de la microspora se puede conseguir mediante el cultivo de anteras o mediante el cultivo de microsporas aisladas.

Desde que Guha y Maheshwari (1964 y 1966) consiguieron la inducción de este proceso *in vitro* en la planta solanácea *Datura innoxia* P.Mill, se han realizado enormes esfuerzos para inducir la androgénesis en un buen número de especies. *Nicotiana tabacum* L. y *Brassica napus* L. son las especies que se usan como modelo para el estudio de la embriogénesis de la microspora, debido a la facilidad con la que se produce en ellas y al alto rendimiento que se obtiene. Aunque en general los cereales responden mal a los sistemas de producción de DHs *in vitro*, en la actualidad, gracias a los avances metodológicos, se han obtenido en algunas especies frecuencias de producción equivalentes a las de algunas dicotiledóneas (Kasha y col. 1990). En cebada se ha incrementado considerablemente la eficiencia del proceso mediante cambios en la composición de los medios y en las condiciones de cultivo (Cistué y col. 1994, 1995 y 1999, Castillo y col. 2000), siendo considerada una especie modelo para el estudio de la embriogénesis de la microspora en monocotiledóneas.

En el Departamento de Genética y Producción Vegetal de la EEAD-CSIC se ha desarrollado un método eficiente de producción de plantas DHs de cebada mediante la embriogénesis de la microspora, utilizando el cultivo de anteras (Cistué y col. 2003) (Anexo I). En este método, las anteras con las microsporas en estado uninucleado se

someten a un tratamiento de estrés al incubarlas en un medio con manitol. A continuación, las anteras tratadas se inoculan en un medio de cultivo donde las microsporas empiezan a dividirse por la vía esporofítica. Las microsporas pueden dar lugar a formaciones de tipo callo o embriones. Los embriones bien diferenciados son transferidos a un medio de regeneración para conseguir plántulas. Aunque las plantas resultantes deberían ser haploides y por tanto estériles, en cebada se dan unos porcentajes muy altos de duplicación espontánea y por tanto se obtienen plantas fértiles completamente homocigotas.

1.4.- Factores que afectan a la embriogénesis de la microspora.

La eficiencia del proceso de producción de plantas DHs mediante androgénesis depende: del número de microsporas que se dividen (inducción); del número de embriones formados (embriogénesis); de su capacidad de regeneración (regeneración); de los porcentajes de plantas albinas (albinismo) y de la capacidad de duplicación cromosómica. Estas variables se ven afectadas por un gran número de factores.

1.4.1.- Genotipo.

El genotipo es el factor con mayor influencia sobre la frecuencia de embriogénesis, de regeneración y sobre el porcentaje de plantas verdes (Moieni y col. 1997, Holme y col. 1999, Forster y Thomas 2005). Se ha observado que el efecto recíproco para estos caracteres es muy pequeño o inexistente, por lo que se concluye que son caracteres que se transmiten mediante genes nucleares (Tuveesson y col. 1989). Se han identificado QTLs asociados a distintos caracteres en la producción de DHs, como el porcentaje de embriogénesis y producción de plantas verdes. En un trabajo realizado por el Departamento de Genética y Producción Vegetal (EEAD-CSIC) identificaron QTLs para el porcentaje de embriogénesis en la región del locus *vrs1* del cromosoma 2H y en el cromosoma 6H para número de embriones. Para el número de plantas verdes se identificaron QTLs en los cromosomas 3H, 5H y 6H, y para el porcentaje de plantas albinas en 3H y 5H (Chen y col. 2007, Muñoz- Amatriaín y col. 2008).

1.4.2.- Estado fisiológico de las plantas donantes.

Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes deben asegurar un buen ahijamiento y el correcto desarrollo de las anteras. Por ello, es necesario que las plantas donantes crezcan en condiciones óptimas con respecto al fotoperíodo, intensidad y calidad de la luz, temperatura y nutrición. Además, deben estar libres de plagas y enfermedades, y el uso de pesticidas o fungicidas debe ser evitado o reducido al mínimo (Cistué y col. 2003). Normalmente se prefiere el cultivo controlado en cámaras de cultivo (Hoekstra y col. 1992, Orshinsky y Sadasivaiah 1997, Bjørnstad y col. 1989).

1.4.3.- Estado de desarrollo de las microsporas.

El estado óptimo de desarrollo de la microspora para poder obtener una inducción eficiente de la embriogénesis, varía según la especie y el método de cultivo. En cebada, se considera que los estadios cercanos a la primera división mitótica (de uninucleado medio a tardío) son los más adecuados para el cultivo de anteras, mientras que los estadios ligeramente más avanzados (de uninucleado tardío a binucleado temprano) son los más apropiados para cultivo de microsporas aisladas (Hoekstra y col. 1992, Touraev y col. 1996a). Una correlación entre el estado de desarrollo de las microsporas y distintos caracteres morfológicos (Cistué y col. 2003, Soriano 2008) facilita la selección de las espigas en los estadios más adecuados.

1.4.4.- Pretratamiento de estrés.

Para cambiar el patrón de desarrollo de la vía gametofítica a la esporofítica es necesario un tratamiento de estrés (Jähne y Lörz 1995, Touraev y col. 1996a). El estrés puede ser ocasionado por cambios de temperatura (Olsen 1987, Touraev y col. 1996b), cambios de la presión osmótica (Hoekstra y col. 1992), la falta de nutrientes (Touraev y col. 1996a), la variación del pH (Barinova y col. 2004) o la aplicación de inductores químicos como la colcicina (Zorinians y col. 2005).

La combinación de frío (4°C) y elevada presión osmótica durante el pretratamiento se ha descrito como el método de estrés más efectivo para el cultivo de microsporas aisladas en la cebada (Hoekstra y col. 1993, Kumlehn y Lörz 1999). En el cultivo de anteras se emplea un tratamiento en manitol, porque además de provocar

estrés por inanición de hidratos de carbono también produce una elevación de la presión osmótica (Ouyang 1986, Cistué y col. 1994, Wojnarowiez y col. 2004).

1.4.5.- Composición de los medios de cultivo.

Para conseguir un aumento en la eficiencia de obtención de plantas DHs en cebada ha sido esencial la sustitución de la sacarosa, como fuente principal de carbono, por la maltosa, y la incorporación de una fuente de nitrógeno orgánico como la glutamina (Hunter 1987, Finie y col. 1989, Fadel y Wenzel 1990). También, la incorporación de Ficoll (polímero de alto peso molecular que incrementa la tensión superficial y la viscosidad del medio) aumentó considerablemente el número de embriones y de plantas verdes (Cistué y col. 1999).

Las modificaciones más importantes del medio de regeneración son la disminución de la concentración de auxinas y/o el aumento de la concentración de citoquininas, así como la reducción de la concentración de azúcares (Castillo y col. 2000, para revisión ver Maluszynski y col. 2003a).

1.5.- Albinismo.

Uno de los fenómenos asociados al cultivo de anteras y microsporas en cereales es la regeneración de plantas deficientes en clorofila (albinas). Estas plantas albinas solo sobreviven *in vitro* durante cortos periodos de tiempo (Dunford y Walden 1991).

Este problema se presenta en la mayoría de los cereales como el trigo (Andersen y col. 1987), cebada (Knudsen y col. 1989), arroz (Guiderdoni y col. 1992), centeno (Immonen 1999) y avena (Kiviharju y Pehu 1998), afectando a muchos genotipos de interés agronómico. En la cebada, el porcentaje de plantas albinas varía desde el 1 al 99,7% dependiendo del genotipo (Careda y col. 2000, Castillo y col. 2000).

1.5.1.- Aspectos generales de los cloroplastos.

Los cloroplastos que se encuentran en las células vegetales fotosintéticas y contienen el pigmento verde llamado clorofila, son los plástidos de mayor importancia biológica (Figura 4). Los cloroplastos tienen una membrana externa que presenta gran

permeabilidad a iones y grandes moléculas. La membrana interna es prácticamente impermeable, pero contiene proteínas transportadoras que facilitan el paso de moléculas. En el estroma se encuentra el DNA plastídico circular y de doble cadena, así como las enzimas que permiten la replicación, transcripción y traducción de la información genética. En el seno del estroma se localizan formaciones membranosas denominadas tilacoides, que forman pilas de sáculos aplanados que son conocidos con el nombre de granas.

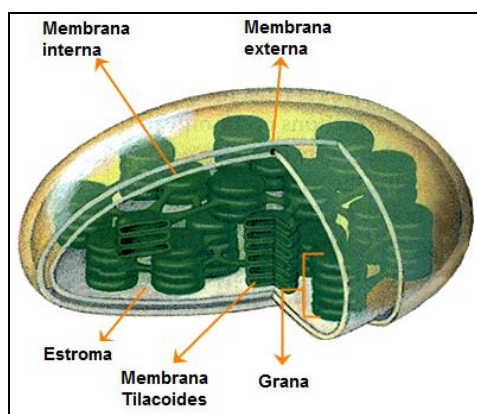


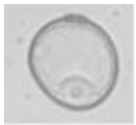

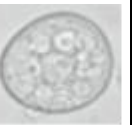
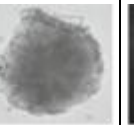
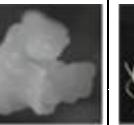

Figura 4.- Estructura de un cloroplasto. Adaptada de <http://www.uc.cl/>.

Los cloroplastos son los orgánulos encargados de realizar la fotosíntesis. Este proceso que se realiza en la membrana de los tilacoides, convierte la energía luminosa en energía química para sintetizar sustancias orgánicas (azúcares, almidón...) a partir de otras sustancias inorgánicas. Los cloroplastos también llevan a cabo otros importantes procesos como la biosíntesis de ácidos grasos y como la reducción de nitratos a nitritos para la obtención de nitrógeno usado en la síntesis de los aminoácidos y de los nucleótidos.

1.5.2.- Cambios morfológicos en los plástidos de las plantas albinas.

Cuando se estudiaron los plástidos de las plantas obtenidas por embriogénesis de la microspora en el cultivar de cebada “Igri”, que produce un gran número de plantas verdes, y en el cultivar “Cork”, que produce un gran número de plantas albinas (Careda y col. 1999, 2000 y 2004), se observaron diferencias que se muestran en la tabla 2 (adaptación de Makowska y Oleszczuk 2013).

Tabla 2.- Cambios en la estructura de los plástidos durante el proceso embriogénesis de la microspora. Adaptación de Makowska y Oleszczuk 2013. Las flechas indican la tendencia relativa a la columna anterior.

		Antes pretratamiento	0 días de cultivo	7 días de cultivo	12 días de cultivo	21 días de cultivo	Plántulas
Características plástidos							
Densidad de plástidos / $100\mu\text{m}^2$	Igri	72,3	2,5↓	Igual	Igual	3,5↑	4,8↑
	Cork	28,7	1,5↓	Igual	Igual	2↑	1,5↓
Longitud del plástido (μm)	Igri	0,76	1↑	1,5↑	2,2↑	2,5↑	4,5↑
	Cork	0,61	1↑	1↑	1↑	1,5↑	1,9↑
Densidad de tilacoides/ $100\mu\text{m}^2$	Igri	0,97	1↑	1,5↑	1,5↑	2↑	12,6↑
	Cork	0,22	0,22↓	Igual	0,5↑	0,5↑	1↑
Contenido de almidón por volumen de plástido (%)	Igri	71,5	26↓	Igual	Igual	Igual	0,5↓
	Cork	44,3	59,8↑	68,1↑	80,5↑	90,3↑	0↓
División plástido/ $100\mu\text{m}^2$	Igri	>1	3↑	4↑	5↑	6↑	-
	Cork	<1	1↓	Igual	Igual	Igual	-

Antes del tratamiento de estrés, los plástidos del genotipo “verde” son más grandes, tienen más tilacoides y granos de almidón, siendo también más numerosos que en el genotipo “albino”. Después del tratamiento de estrés (0 días de cultivo), el número de plástidos se reduce drásticamente en los dos genotipos. Pasados unos días en cultivo, en Igri, el número de plástidos fue mucho mayor que en Cork con una tasa de división más alta. Por otra parte, en Cork, la mayoría de los plástidos derivan a amiloplastos y presentan una estructura interna menos compleja. Se ha propuesto que el estrés sería capaz de cambiar el patrón de desarrollo de la microspora pero no el de los plástidos en los genotipos albinos, siguiendo éstos un desarrollo por la vía gametofítica que conduce a la regeneración de plantas deficientes en clorofila (Makowska y Oleszczuk 2013).

1.5.3.- Genoma del plástido.

El genoma del plástido de las plantas verdes se considera altamente estable. Sin embargo, estudios moleculares revelaron que el fenotipo albino se asociaba con grandes deleciones y reordenamientos en el genoma de los plástidos en trigo (Day y Ellis 1984, Gully 1996, Hofinger 1999), cebada (Day y Ellis 1985, Dunford y Walden 1991, Mouritzen Bach y Holm 1994) y arroz (Harada y col. 1991, 1992). La deleciones pueden ser simples o multiples y tienen un tamaño desde 10 a 100 kbp. La región

menos estable del genoma del plástido contiene genes responsables de la fotosíntesis, por ejemplo, genes que codifican las proteínas del fotosistema I y II. El tamaño de delecciones puede ser dependiente del método de regeneración, con más alteraciones en las plantas derivadas de callos que en las obtenidas directamente de los embriones (Day y Ellis 1985). No se conocen los mecanismos por los que se dan estos reordenamientos, ni tampoco que ocurre en las plantas albinas en las que no se han detectado delecciones (Day y Ellis 1984, Dunford y Walden 1991, Harada y col. 1991, Hofinger y col. 2000). La existencia de estas plantas indican que las delecciones no pueden ser la causa primaria del albinismo.

Lo que parece común en las plantas albinas es su patrón de transcripción alterado, en el que destaca su bajo nivel de transcripción de los genes relacionados con la fotosíntesis y niveles más altos de transcripción para los genes de mantenimiento de mecanismos moleculares básicos, aunque también se han observados niveles de transcripción bajos en los genes de RNA ribosomal (ver revisión en Makowska y Oleszczuk 2013).

1.5.4.- Genoma nuclear.

Para el correcto funcionamiento de los cloroplastos se requiere tanto la contribución del genoma del plástido como del nuclear, ya que la mayor parte de las proteínas de los plástidos están codificadas por genes nucleares.

A partir de estudios genéticos que implicaban cruzamientos recíprocos, se demostró que el control del albinismo en la embriogénesis de la microspora en cebada es nuclear (Tuveesson y col. 1989, Larsen y col. 1991). Para identificar los loci asociados al porcentaje de albinismo se llevó a cabo un estudio por el Departamento de Genética y Producción Vegetal (EEAD-CSIC), en una población específica (Igri x DH46). En este estudio se identificaron dos QTLs para el porcentaje de plantas verdes situados en los cromosomas 3H y 5H (Muñoz- Amatriaín y col. 2007). La varianza fenotípica explicada por estos QTLs fue del 65.20%. En otros cereales ya se habían asociado QTLs para este carácter en regiones sintéticas en el cromosoma 3R de triticale (González y col. 2005) y en 5A de trigo (Grosse y col. 1996, Torp y col. 2001).

El efecto de la expresión génica de genes nucleares sobre la expresión del genotipo albino, también se estudió utilizando microarrays comerciales (Muñoz-

Amatriain y col. 2009b). Se observó que en la fase de inducción de la embriogénesis de la microspora (tratamiento de estrés), en la línea albina había una mayor expresión de genes nucleares relacionados con el desarrollo y diferenciación de plástidos: el gen *DAG* (Differentiation And Greening) implicado en el desarrollo temprano de plástidos (Chatterjee y col. 1996), el gen *AKR* que actúa en la diferenciación de cloroplastos a partir de proplástidos (Zhang y col. 1992) y el gen *ABI3* parece jugar un papel clave en la determinación de la identidad de los plástidos (Rohde y col. 2000). Por otra parte, la línea albina presentaba una menor expresión de genes implicados en la transducción de la señal núcleo-plástido.

1.5.5.- Factores fisiológicos.

Aunque el albinismo presenta una fuerte dependencia del genotipo, también está influenciado por factores fisiológicos. Estos factores fisiológicos como el estado de desarrollo de la microspora (He y Ouyang 1984, Liang y Hassawi 1990), el pretratamiento de estrés (Touraev y col. 1996a, Kunz y col. 2000), las condiciones de temperatura e iluminación durante la incubación (Huang 1987, Ekiz y Konzak 1997), el medio de cultivo (Liang y Hassawi 1990) y la duración del cultivo (Cistué y col. 1995, Puolimatka y Pauk 2000) se han intentado manipular para disminuir el número de plantas albinas que se producen por el cultivo de anteras.

Así, las condiciones óptimas para reducir el porcentaje de albinismo, implican la utilización de microsporas en un estado de desarrollo de microspora uninucleada medio a tardío (Apartado 1.4.3). Durante el período de pretratamiento de estrés, el uso de manitol como agente osmótico dió los mejores resultados en producción de plantas verdes (Wojnarowicz y col. 2004).

La composición de los medios de cultivo de anteras también juega un papel importante en la regeneración de plantas verdes. El uso de concentraciones apropiadas de sulfato de cobre (Wojnarowicz y col. 2002) y de maltosa en los medios de inducción y de regeneración de plantas (Cistué y col. 1994) disminuye el albinismo. Así mismo, se observaron frecuencias altas de plantas albinas asociadas con periodos largos de cultivo (Puolimatka y Pauk 2000), así en trigo, se determinó que los embriones debían ser transferidos a un medio de regeneración en menos de 7 semanas después del aislamiento de anteras.

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es determinar los mecanismos moleculares asociados al albinismo en las fases iniciales de la embriogénesis de la microspora en cebada. Se han utilizado tres colecciones diferentes de genes y de muestras para lograr los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de genes asociados al albinismo en hoja de plantas regeneradas de cultivo de anteras de variedades con alto porcentaje de albinismo.
2. Identificación de genes asociados al albinismo en las primeras fases de cultivo de anteras de las líneas DHs de cebada DH6148 y DH6183 con distinto porcentaje de albinismo.
3. Identificación de genes asociados al albinismo en las primeras fases de cultivo de anteras en variedades con alto y bajo porcentaje de albinismo.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal.

3.1.1.- Genotipos utilizados.

Se seleccionaron las líneas doblehaploides DH6148 y DH6183 de una población obtenida previamente en el grupo de trabajo, a partir del cruzamiento Igri x DH46. El cultivar de invierno Igri presenta muy buena respuesta al cultivo de anteras y un porcentaje de albinismo bajo, por ello se considera una variedad modelo para la embriogénesis de la microspora en cebada. La línea DH46 se obtuvo del cruzamiento Igri x Dobla (Chen y col. 2007) y presenta una buena respuesta al cultivo de anteras, pero un porcentaje muy alto de albinismo (Muñoz- Amatriáin y col. 2008). Las líneas DH6148 y DH6183 son por tanto líneas casi isogénicas que se diferencian, en el alto porcentaje de embriogénesis (%EMB) y bajo porcentaje de albinismo (%ALB) de la línea DH6148 frente al bajo porcentaje de embriogénesis (%EMB) y alto porcentaje de albinismo (%ALB) de la línea DH6183 (Tabla 3).

Tabla 3.- Características de la respuesta del cultivo de anteras de las líneas DH6148 y DH6183. En la tabla se representa: (nAR) número de anteras que responden a la inducción/100 anteras inoculadas; (nDIV) número de divisiones/100 anteras inoculadas; (nEMB) número de embriones/100 anteras inoculadas; (%EMB) $(nEMB/nDIV) \times 100$; (nPV) número de plantas verdes/100 anteras inoculadas; (nPA) número de plantas albinas/100 anteras inoculadas y (%REG) $(nPV+nPA/nEMB) \times 100$ y (%ALB) $(nPA/(nPV+nPA)) \times 100$.

Genotipo	nAR	nDIV	nEMB	%EMB	nPV	nPA	%REG	%ALB
DH6148	87,50	2165,83	465,83	21,50	363,33	15,83	81,39	4,17
DH6183	81,67	2646,67	171,67	6,49	6,67	46,67	31,07	87,49

También se utilizaron para este estudio, distintas variedades comerciales de cebada con alto valor agronómico. Las variedades seleccionadas fueron Vanessa, Orelie y Volley como variedades de 2C y de invierno; Static y Riviera como variedades de 2C y de primavera y Siberia como variedad de 6C y de invierno. La mejor respuesta al cultivo de anteras la presentaba la variedad Orelie con 220,92 plantas verdes por 100 anteras sembradas (nPV) (Tabla 4). En las otras variedades, el número de plantas verdes estaba condicionado por una parte por la baja respuesta, como en Volley con 85,97 embriones y 31,82 plantas verdes por 100 anteras sembradas, o bien por el albinismo como en las variedades Vanessa, Siberia, Static y Riviera, que siendo buenas en sus respuestas generales al cultivo de anteras presentaban altos

porcentajes de albinismo (100%, 93,01%, 90,26% y 92,59% respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 4.- Características de la respuesta del cultivo de anteras de las variedades de importancia agronómica: Vanessa, Siberia, Static, Orelie, Volley y Riviera. En la tabla se representa: (nAR) número de anteras que responden a la inducción/100 anteras inoculadas; (nDIV) número de divisiones/100 anteras inoculadas; (nEMB) número de embriones/100 anteras inoculadas; (%EMB) $(nEMB / nDIV) \times 100$; (nPV) número de plantas verdes/100 anteras inoculadas; (nPA) número de plantas albinas/100 anteras inoculadas; (%REG) $(nPV + nPA / nEMB) \times 100$ y (%ALB) $(nPA / (nPV + nPA)) \times 100$.

Variedad	nAR	nDIV	nEMB	%EMB	nPV	nPA	%REG	%ALB
Vanessa	49,72	2098,47	232,22	11,07	0	66,52	28,65	100,00
Siberia	65,77	2614,72	182,61	6,98	6,45	85,77	50,50	93,01
Static	79,54	1578,83	219,44	13,90	11,13	103,09	52,05	90,26
Orelie	98,12	3869,21	393,66	10,17	220,92	6,53	57,78	2,87
Volley	47,53	984,41	85,97	8,73	31,82	0	37,01	0
Riviera	78,75	2936,25	305,00	10,39	7,50	93,75	33,20	92,59

3.2.- Genes analizados.

Para este trabajo se han utilizado tres colecciones de genes (Tabla 5). Dos de ellas derivan de trabajos previos del grupo: (EM) Colección de genes inducidos en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora, y que mediante la categorización funcional en TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource), utilizando las homologías de secuencia en *Arabidopsis*, se asociaron al componente celular plástidico (Vallés y col., resultados no publicados) y (QTL-Alb) colección de genes asociados a plástidos que han sido mapados en regiones cromosómicas, donde se había localizado algún QTLs de albinismo en cultivo de anteras (QTL-Alb) (Muñoz-Amatriain y col. 2008).

La tercera colección se seleccionó del trabajo publicado por Svensson y col. (2006), en el que se estudiaba la relación entre los cloroplastos y la respuesta al estrés por frío. Los genes seleccionados permitían diferenciar entre distintos tipos de mutantes albinos de cebada (M-Alb).

Tabla 5.- Colecciones de genes seleccionadas para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a albinismo: (EM) seleccionados en embriogénesis de la microspora; (QTL-Alb) mapados en regiones cromosómicas asociadas a albinismo y (M-Alb) asociados a mutantes albinos de cebada. El código para nombrar los genes es el correspondiente al “Barley1 GeneChip” (Affymetrix).

EM	QTL- Alb	M-Alb
Contig11738_at	Contig4499_s_at	HV_CEb0002J23r2_s_at
Contig1314_s_at	Contig2515_at	Contig2742_at
Contig13277_at	Contig7192_at	Contig7944_at
Contig14691_at	Contig7090_s_at	Contig12692_s_at
Contig14780_at	Contig2278_at	Contig10615_at
Contig16148_at	Contig6276_s_at	Contig9813_at
Contig16389_at	Contig12110_s_at	Contig1800_at
Contig16595_at	Contig4021_at	Contig4811_s_at
Contig17155_at	Contig9559_at	Contig2721_at
Contig17319_at	Contig4586_at	Contig418_at
Contig19088_at	Contig4470_s_at	Contig5059_s_at
Contig2243_s_at	Contig6695_at	Contig14378_at
Contig23344_at	Contig11071_at	HV09F14u_at
Contig23926_at	Contig8361_at	Contig3221_at
Contig24791_at	SNP 6170-304	Contig828_s_at
Contig24914_at	Contig6598_at	Contig19438_at
Contig25153_at	Contig9219_at	Contig13481_at
Contig26034_at		Contig2992_s_at
Contig4380_s_at		Contig9152_at
Contig5004_at		Contig12724_at
Contig5708_at		
Contig6640_at		
Contig6817_at		
Contig7509_at		
Contig8790_at		
Contig9121_at		
Contig938_s_at		
Contig9412_s_at		
HVSMEb0007O01f_at		
HVSMEb0013I03r2_at		

Para asignar una funcionalidad a los distintos genes seleccionados se determinó las homologías de secuencia de estos genes utilizando la información

recogida en distintas bases de datos, como UniProt de carácter general, MSU de arroz y TAIR de Arabidopsis, mediante el programa HarvEST Barley v.1.74. El criterio de similitud de secuencia fue de 9, en una escala de 1 a 11.

3.3.- Estudios de expresión génica.

Para los estudios de expresión génica fue necesario realizar distintos pasos, desde la recogida del material vegetal hasta la amplificación de genes concretos. Estos pasos se resumen en la siguiente figura (Figura 5).

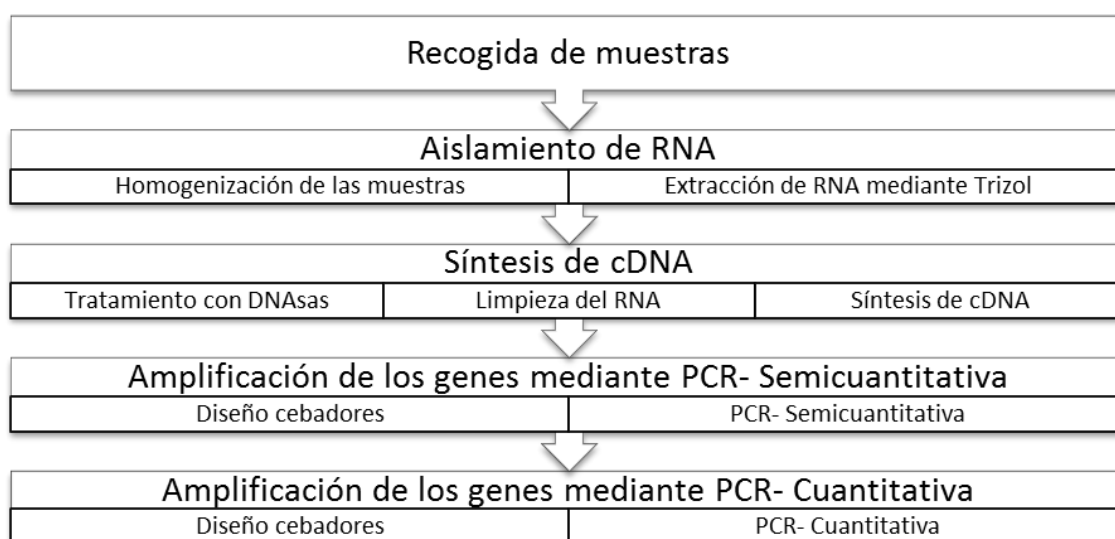


Figura 5.- Pasos seguidos para los análisis de expresión génica.

3.3.1.- Recogida de muestras.

Para este trabajo se tomaron tres colecciones de muestras. La primera estaba compuesta de muestras de hoja albina (A) y hoja verde (V) de plántulas obtenidas mediante cultivo de anteras de las variedades Vanessa, Siberia y Static. Las otras colecciones se tomaron durante las primeras fases de la embriogénesis de la microspora en dos materiales distintos: una colección comprendía muestras de anteras de las líneas DH6148 y DH6183 antes del tratamiento de estrés (0dp), después de 4 días de inducción por estrés (4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc, 16dc), y la otra comprendía muestras de anteras de las variedades Orelie, Volley y Riviera antes del tratamiento de estrés (0dp), después de 4 días de inducción por estrés (4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc, 10dc).

Para cada una de las muestras de los distintos estadios de cultivo de anteras se tomaron 400- 500 anteras. Para las muestras de hoja se tomaron 100mg de tejido.

Todas las muestras se congelaron en N₂ líquido en tubos Eppendorf de 1,5ml y se conservaron a -80°C (Figura 6.a, b y c).



Figura 6.- Recogida de muestras: a) Recogida de anteras en cultivo; b) Congelación de las muestras con N₂ líquido y c) Muestra congelada en N₂ líquido en un tubo Eppendorf de 1,5ml.

3.3.2.- Aislamiento de RNA.

Para evitar la degradación del RNA por las Ribonucleasas (RNasas) es necesario seguir una serie de recomendaciones generales como la utilización de guantes, la esterilización del material mediante autoclave (40min a 120°C y 1Kg/cm²) y utilizar soluciones libres de RNasas mediante el tratamiento del H₂O con DEPC (dietilpírocarbonato 97% NMR) al 1‰ (v/v) durante 2h.

3.3.2.1.- Homogeneización de las muestras.

Para homogeneizar los tejidos se utilizó el Molino Mezclador MM 301 RETSCH con el Kit criogénico (Figura 7.a).

A cada tubo que contenía las muestras congeladas a -80°C, se añadieron tres bolitas de acero inoxidable para facilitar la rotura de los tejidos (Figura 7.b). Los tubos se colocaron en un bloque criogénico que se mantuvo sumergido en N₂ líquido (Figura 7.c) para mantener la integridad de las muestras a baja temperatura (-196°C) y evitar la acción de las RNasas.

Los bloques se acoplaron al molino (Figura 7.d) y las muestras se trituraron durante 2min a 1.800rpm (Figura 7.e). Al finalizar el proceso, los bloques criogénicos se mantuvieron de nuevo en N₂ líquido.

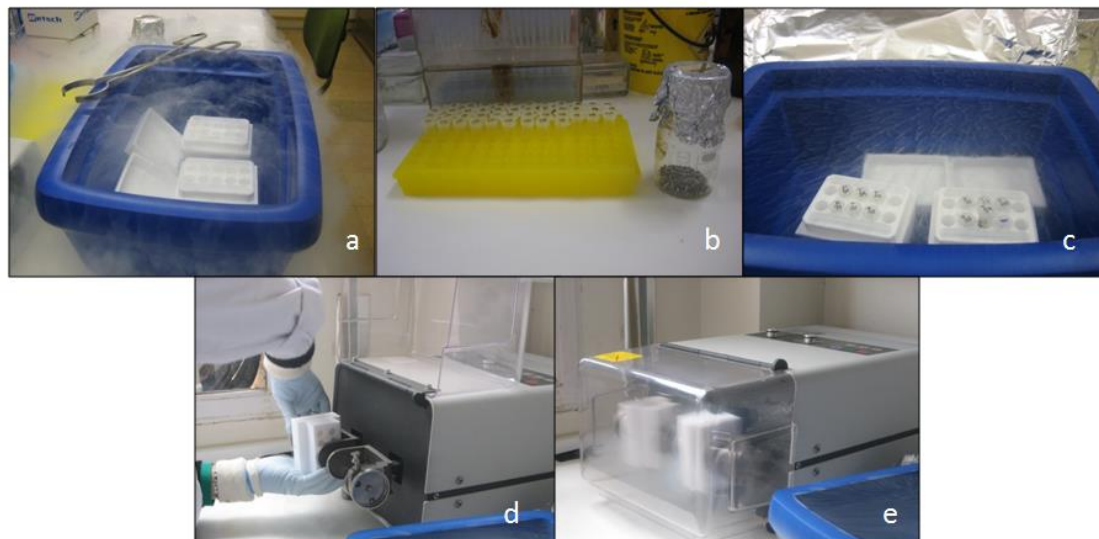


Figura 7.- Homogeneización de muestras mediante el Molino Mezclador MM 301 RETSCH: a) Kit criogénico con bloques criogénicos y unas pinzas para manipular los bloques en N₂ líquido; b) Tubos Eppendorf de 1,5ml con las muestras y bolitas de acero para facilitar la homogeneización; c) Tubos con las muestras dentro de los bloques criogénicos en N₂ líquido; d) Acoplado de los bloques criogénicos al molino y e) Agitación de los bloques en el molino a 1800rpm durante 2min.

3.3.2.2.- Extracción de RNA mediante Trizol.

Para la extracción de RNA se siguió el procedimiento que utiliza como reactivo básico el Trizol® (Invitrogen). Esta técnica permite la disociación de proteínas y la eliminación de los componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad. Se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

En una campana de extracción de gases, a cada tubo Eppendorf con muestra molida se agregaron 500µl de Trizol® y se agitó suavemente por inversión (Figura 8.a). Las muestras se incubaron en un bloque seco (AccuBlock Digital Dry Bath de Labnet) durante 5min a 60°C, para permitir la completa disolución de los complejos nucleoproteicos (Figura 8.b).



Figura 8.- Extracción de RNA mediante Trizol®: a) Tratamiento de las muestras con Trizol® en la campana de extracción de gases; b) Incubación de las muestras en bloque seco durante 5min a 60°C y c) Separación de la fase superior hidrosoluble que contiene el RNA.

A continuación, se realizaron los siguientes pasos:

- Separación de fases:

De nuevo en la campana de extracción de gases se añadieron 100µl de cloroformo y se agitaron fuertemente los tubos durante 15s. Se incubaron 3min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 12.000rpm en la centrífuga Biofuge Primo R de Heraeus a 4°C durante 15min.

Después de la centrifugación se distinguieron dos fases (Figura 8.c y 9): una fase inferior que contiene lípidos y proteínas solubles en disoluciones orgánicas y restos celulares, y una fase superior acuosa, menos densa, la cual contiene el RNA junto a polisacáridos, otros ácidos nucleicos y pequeñas moléculas hidrosolubles.

La mayor parte de las proteínas son retenidas en la interfase debido a sus características hidrofóbicas e hidrofílicas.

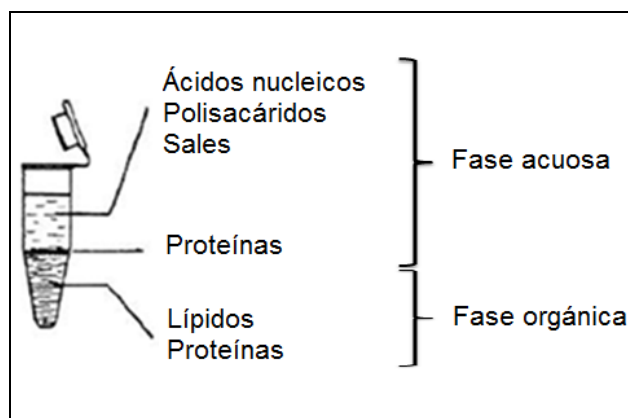


Figura 9.- Resultado de la separación de fases en la extracción de RNA mediante Trizol® (Hernández y col. 1994)

A continuación, se extrajo cuidadosamente la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5ml (Figura 8.c).

- Precipitación de ácidos nucleicos:

Se añadieron 250µl de propanol a cada muestra y se mezcló suavemente por inversión en la campana de extracción de gases. Se incubó 10min en hielo y posteriormente se centrifugó a 12.000rpm a 4°C durante 10min para recoger el RNA en el precipitado.

- Lavado:

Se desechó el sobrenadante y se añadieron 500µl de etanol al 75% en H₂O DEPC. Las muestras se agitaron en un vórtex para limpiar el precipitado y se centrifugaron a 7.500rpm a 4°C durante 6min.

- Redisolución:

Se desechó el sobrenadante del lavado y se dejó secar el precipitado durante 5min a temperatura ambiente. Se añadieron 100µl de H₂O DEPC, se agitó en vórtex, se centrifugó 10s en una microcentrífuga (Biofuge Pico de Heraeus) y posteriormente se incubó en un bloque seco a 60°C durante 10min, para la completa disolución de RNA.

- Medición y visualización del RNA:

La calidad y cantidad del RNA se determinó utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) (Figura 10).



Figura 10.- El equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) se empleó para cuantificar el RNA en cada muestra.

Para cada muestra se midieron los valores de concentración de RNA en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se determinó su pureza. Los valores de la relación de absorbancias 260/280 cercanos a 2,0 y de la relación de absorbancias 260/230 cercanos a 2,0 – 2,2, son aceptados como indicadores de una muestra de RNA puro.

También se comprobó el estado de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa (MS-12 Conda) al 1,2% en tampón TBE (0,5x en H_2O DEPC). Este método separa macromoléculas tales como ácidos nucleídos en función del tamaño y la carga eléctrica. Para la visualización de las muestras, se añadió bromuro de etidio (BrEt) (Tabla 6).

Tabla 6.- Composición del gel de agarosa y de la muestra, utilizados para la electroforesis de RNA.

Gel de agarosa	1,2% Agarosa	0,7g
	TBE (0,5x en H_2O DEPC)	60ml
Muestra	RNA (2,5 μg totales)	$x\mu\text{l}^*$
	Tampón de muestra	3 μl
	BrEt (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl
	H_2O DEPC	$x\mu\text{l}^*$
	Volumen total	15 μl

$x\mu\text{l}^*$ (depende de la concentración de RNA de cada muestra)

La electroforesis se efectuó a 100V en el equipo E300 de Pharmacia Biotech durante 20min. Para la visualización del gel se utilizó el programa Quantity One 4.6.7 en el trasiluminador con luz ultravioleta del Gel Doc 2.000 de Bio Rad (Figura 11).

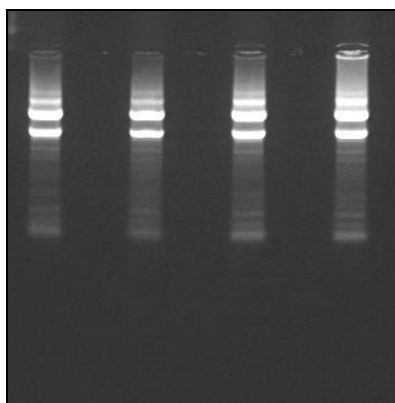


Figura 11.- Comprobación del estado de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa. Visualización mediante bromuro de etidio y luz ultravioleta.

3.3.3.- Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de los RNA extraídos para cada una de las muestras, mediante la enzima transcriptasa reversa.

3.3.3.1.- Tratamiento con DNAsa I.

Para eliminar restos de DNA genómico se realizó un tratamiento con DNAsa I. Para ello se tomaron 10µg de RNA y se diluyeron a un volumen final de 100µl con H₂O DEPC en tubos de 1,5ml. Para la digestión se añadieron 2µl de DNAsa I (10u/µl de Roche) y se incubaron 10min a 37°C. Posteriormente se trataron las muestras 15min a 65°C en bloque seco, para la inactivación del enzima.

3.3.3.2.- Limpieza del RNA- RNeasy MinElute Cleanup Kit.

Se utilizó el RNeasy MinElute Cleanup Kit (50) de Quiagen (Figura 12.a), para limpiar el RNA del resto de contaminantes arrastrados durante el proceso de extracción. Se siguió el protocolo descrito en las especificaciones del Kit.

A las muestras de RNA se añadieron 350µl de buffer RLT y a continuación 250µl de Etanol al 100%. Los 700µl resultantes se depositaron sobre una columna que contiene una membrana de sílice (Figura 12.b y c) y ésta sobre un tubo colector de 2ml (Spin Columnn). Se centrifugó a 10.000rpm en la microcentrífuga durante 15s.

Se transfirió la columna a otro tubo colector de 2ml, se añadieron 500µl de buffer RPE y se centrifugó a 10.000rpm durante 15s. Seguidamente se eliminó el fluido

restante y se añadieron a la columna 500µl de etanol al 80% en H₂O DEPC y se centrifugó a 10.000rpm durante 2min. La columna se transfirió a otro tubo colector de 2ml y para eliminar el etanol se centrifugó a 13.000rpm durante 5min (Figura 12.d), ya que el etanol residual puede interferir con las siguientes reacciones.

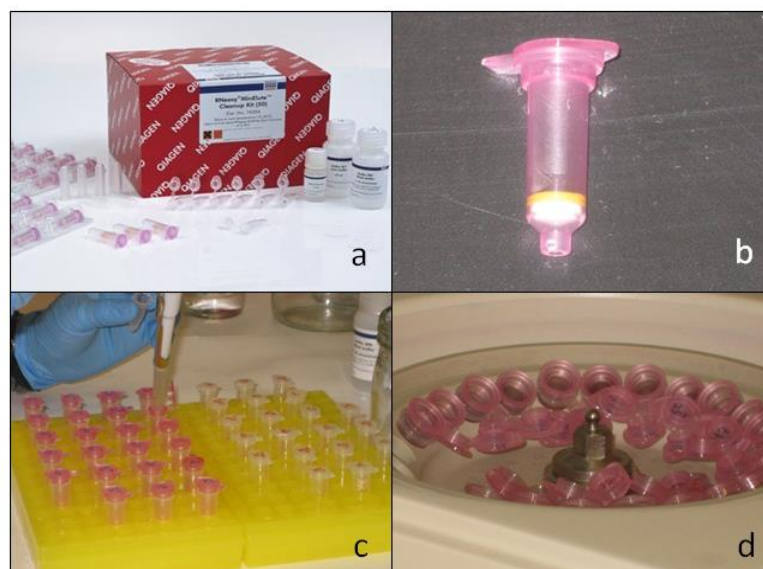


Figura 12.- Limpieza del RNA con el RNeasy MinElute Cleanup Kit: a) RNeasy MinElute Cleanup Kit (50) de Quiagen; b) Columna que contiene una membrana de sílice para retener el RNA; c) Aplicación de las muestras a las columnas y d) Centrifugación de las muestras para que pasen a través de la membrana de la columna.

Posteriormente la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5ml y se añadieron 10µl de agua libre de RNasas directamente en el centro de la membrana. Se centrifugó a 13.000rpm durante 1min para recoger el RNA de las membranas. Finalmente se repitió la operación con otros 10µl de agua (20µl volumen final).

3.3.3.3.- Síntesis de la cadena de cDNA.

Para la síntesis de cDNA, a cada tubo que contenía los 20µl de RNA, se añadió 1µl de Oligo (dT)₂₀ Primer de Invitrogen. Las muestras se incubaron a 70°C durante 10min. Estos Oligo (dT)₂₀, se unen a la cola poliA de los mRNA, estableciendo un punto de comienzo de la síntesis del cDNA.

La mezcla de la reacción para la síntesis de cDNA se preparó en un volumen final de 30µl tal como se detalla en la tabla 7.

Tabla 7.- Composición de la mezcla de la reacción para la síntesis de cDNA.

H ₂ O DEPC 16,7µl	x N° de reacciones	=	µl H ₂ O DEPC
Buffer RT 10µl	x N° de reacciones	=	µl buffer RT
dNTPs (20mM) 1,8µl	x N° de reacciones	=	µl dNTPs
Inhibidor de RNAsa 0,5µl	x N° de reacciones	=	µl inhibidor de RNAsa
RT (transcriptasa reversa) (200u/ µl) 1 µl	x N° de reacciones	=	µl RT

Para preparar la mezcla se tuvo en cuenta el número de reacciones, no obstante sumamos una reacción más, ya que al pipetear constantemente se tienen pérdidas. El volumen final de la reacción por cada muestra debe de ser 50µl (30µl del Mezcla de reacción + 20µl de RNA). Se centrifugó 10s y se incubó 1h a 42°C en el bloque seco.

A continuación detallamos las características y la casa comercial de cada reactivo:

- Buffer RT y enzima RT: M-MLV RT 5x Buffer y M-MLV Reverse Transcriptasa 10000u 200u/µl de Promega.
- dNTPS: DNA Polymerization Mix 20mM de Amersham Biosciences.
- Inhibidor de RNAsa: protector RNAsa Inhibitor 2000u de Roche.

Se realizó una aproximación a la calidad y cantidad del cDNA utilizando el equipo Nanodrop 2.000. Para cada muestra se midió la concentración de cDNA en µg/µl y la pureza de este (relación de absorbancias a 260/280). Para posteriores análisis se tomaron 5µg de cDNA y se diluyeron a un volumen final de 100µl con H₂O milliQ en tubos de 1,5ml.

3.3.4.- Amplificación de genes mediante PCR-Semicuantitativa.

3.3.4.1.- Diseños de cebadores.

Para el diseño de los cebadores se partió de las secuencias “consensus” de cDNA correspondientes a los genes a estudiar, contenidas en el programa HarvEST Barley V.1.74 (Tabla 8, 9, 10 y 11). Las secuencias de los cebadores han de ser complementarias a los dos extremos de la región diana, para que se amplifique esa zona. Los cebadores se diseñaron mediante el programa PrimerQuest (Integrated DNA Technologies), siguiendo los criterios:

- La longitud de los cebadores debe ser de 18-24 pares de bases (bp).
- La T_m (temperatura de fusión) debe estar entre 55-63°C. La diferencia de T_m entre los dos cebadores no debe ser superior a 5°C.
- El contenido de GC debe estar entre 45-55 %, teniendo en cuenta que las últimas cinco bases no tengan más de dos GC.
- Un aspecto importante es evitar la complementariedad de bases en y entre los cebadores, para que no se formen bucles y evitar la formación de dímeros.
- La longitud óptima del amplicon resultante debe estar entre 250 y 300pb.

Los cebadores diseñados fueron sintetizados por Invitrogen. Se preparó una solución stock de 200µM y una dilución final de 20µM en H₂O miliQ.

Tabla 8.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes a los genes de la colección EM.

Probe	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Contig11738_at	GATCACGGCGAGACAGATAGAA	TTTACTGGCCGCTATGGAGA
Contig1314_s_at	AAGTCCGACATCGTCATCGAG	ACACCTCAGCCATCAGGATT
Contig13277_at	ACGGTTGAAGCATCTGCGTGAT	AGTGGTGGCATCGTCTCTTTGA
Contig14691_at	TTGACACGGAGACGAGCAAT	ATCATCTTCGGCATCGTCCT
Contig14780_at	TCGTGCAGACCAATCACCAA	TTAGGGTCGAACAGCGACTT
Contig16148_at	ACACACATACTGCCCCACTCA	TTGGCATCAGGAGGAAGCAA
Contig16389_at	ACAGAAGAGCTGATGGCTGT	TTCATTGAGCTTGTGCCCCCT
Contig16595_at	AGCTCGATGAAACCACGCTAGT	TCGGAGTTCAGGTTCTCTTGGA
Contig17155_at	TCACCGGCAACACAGTTGAGAA	TTGCCCAGGATCAGTTTCGGTT
Contig17319_at	AAACATGATGCGGGCAGACGAT	AACGCAACCCAAGGCTGCTAAT
Contig19088_at	ATCCGCAAGACCAGCTACAAGA	AGCCGCTACTCAACAATCTCCA
Contig2243_s_at	ATCGGCAGCCATGAAGAGCA	TGAAGCCCTGAAGCGATCAGT
Contig23344_at	TGCAGCCAAACAAATCGGGAAC	AGCACACGGTGACTAGACTGAA
Contig23926_at	TTCTGAGGACGAGGGATGCAAT	TCTGTGTCAAATCCTCCGGCAA
Contig24791_at	AACGGAGAAATCGTCCAGCGATCA	TACAATGCAGCAAAGACGCCGA
Contig24914_at	CCCACCACAGAAGCAGATGAAT	AAGACCTCGACTGGTTTGGGTA
Contig25153_at	AGATCAAGCAGATCCGTGGTGA	AACGATGACGAACAGCGCAT
Contig26034_at	GCAGTCGAACCTGAGACCATAA	ACAAGGGCATGTGCGAAAAGA
Contig4380_s_at	TCCATGATGTGCTCCTACTCCT	GCTGCTTCTTGGTCTTGTGGTT
Contig5004_at	ATACGAGTCACTGTCCCACCAT	AACCTTGCTCAGCTCCTGTT
Contig5708_at	GCCTCCAAGGAAGGATCAGTTT	AGCCAACATAGGTGCCAGTT
Contig6640_at	AAACCGCCATTGAGGACAGTGA	TCTTCTAGCCGGTCCCTTTATGGT
Contig6817_at	TCAGCCATGTTTCTCGTGCCAA	TCATGTGCCGGTCAGACGTT
Contig7509_at	TGCCTTCAGCACAACCACTT	TGTTGTTTCGGTCTCCTGCT
Contig8790_at	AGATGGCTGACCCAATGCTT	AATGATGGTTTGGCGAGCGT
Contig9121_at	TATGCGTGAAAGCGGCCATT	TGCAGCCTTTGCCTTTGGTT
Contig938_s_at	TGGATCATCTCCGGCTTCTGCTAT	TTCGAGGCAGATTGGGCAAACA
Contig9412_s_at	ACCTGGGAATTGGGAAGATGGT	ACTGCCGTGTTCTTCAGCGA
HVSMEm0007O01f_at	TAAATTCCGTGGGTGGCGTA	AGGAATGAATGGCTCGGCTA
HVSMEm0013I03r2_at	TCCTCGTTCCTGAGCTTCGACAT	AACGCCAAGTTTGTGGACGTGA

Tabla 9.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes a los genes de la colección QTL-Alb.

Probe	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Contig4499_s_at	TCCAACCTCGGCAATCATGT	TGTGCATTAGGCTCCACCTT
Contig2515_at	ACATTGCATCTGCGTCCAAGTG	ATTCATCCCTTCATCTCCGCCT
Contig7192_at	TTGCACTCTGTAGCGGCAGTTT	ACTTTGGCGGCAGAATCCAGAA
Contig7090_s_at	TTGGAAATGCCGCCAAGGTTGT	TGTTGCATTTCAGCGCGTCTTCA
Contig2278_at	TTAAGGGCATGGAGAAGGGCAT	TTGATGATCGCGGTGCTACACA
Contig6276_s_at	AAAGCGACTGCCTCGTGAAA	AACTCCAGGGCTTGTTGCAT
Contig12110_s_at	TGGGCATGTCTATGCGTGTT	ACCCGAAGCAGCAATTCACT
Contig4021_at	TGTCTGCGACCAATGCTATCCA	TTCTTTTCGGTTACTGGGCCTT
Contig9559_at	ATTAGCTGAGCGGTTGGGTT	AGCAGTTGCCTTGCTGAAGA
Contig4586_at	ATGCTGGGCACTACATTCT	AGGCAGCAAGGCAAGATACA
Contig4470_s_at	TTAGGATTCGGGAGCTGGGTTT	AAACTGATGCCAACGCCCAT
Contig6695_at	TTCTCCAGGTGCCAACAACA	TCCTTCCATGCGTTCCTTCT
Contig11071_at	ACGATGTCCAAGTCGTGCAA	GTGACAATTCGGCTGCAAGT
Contig8361_at	TGGCAAAGGCAGTTGGCTACA	AGGCTGGCAGTTGCTTCACTT
SNP 6170-304	TTTGTTTGAGCGGGAGGCAT	ACGCCGTTGAACTTGACCTT
Contig6598_at	TGATCTCACGGGCTTCATCA	TGTCGTAGTTGCCAAACCCA
Contig9219_at	ACGGCAGGCTTTGATTTGACGA	TCGTCTGTTCCGCTAACTGGACT

Tabla 10.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes a los genes de la colección M-Alb.

Probe	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
HV_CEb0002J23r2_s_at	AACCCTTAAACTCCGGCAACGA	ACGAGGCCAAATCCTGCTGTT
Contig2742_at	ACCCTCGTCCTCAAATGCAA	ACCGCAACATGGAAACACCA
Contig7944_at	AAGGACATCTTCACGGCGAT	AAGAAGAAGGTGAGCGCGTA
Contig12692_s_at	ACATGGTGATGGACTACTGCGA	TACTACCATTGCTACGCCTACAG
Contig10615_at	CGCCATCCTCTTCGAGCACATA	TTCATCTCACTGTCGTGGCTTGT
Contig9813_at	TTCGGCAACGGCTTCTTCCA	AGTAACAACGCCACCGCAACTA
Contig1800_at	ACTTGACCCACAAGCTGAAGCA	TTGCCACGAGAAACGTCGATGA
Contig4811_s_at	TCAAGGAGGTTGGCGACATT	GTTGAACATTTCCGGCGGTGA
Contig2721_at	ACAAGCTGAGCAAGCTGGAAGA	ACGACATGACACGGAAGCAGAA
Contig418_at	AAGACTGCGGCAAAGGCAAA	CCTCACCAAACCTTGACGCCATT
Contig5059_s_at	ACAAGCTGGAGCCAATCGAGAA	TGGTTCACCGCCCATTGATGT
Contig14378_at	TGTGGGAAAGGATGGACGAGTT	ACGTTGCTGTGCCTGTTGTT
HV09F14u_at	CCTGTGATACTTTCATGCCATCCG	CAACAAATCGGCTCAGTTGGGT
Contig3221_at	ACCTCGCCAAGCAGAAGAAA	TGTTTGCGTGCTGGATGTGA
Contig828_s_at	TCAAAGCATCCTCGCCATCT	TTGTTGACAGGGTCGGCAAT
Contig19438_at	AGCTCATCCGTCTGTGACAAGT	ACCAGGCGTACACGTTGAAG
Contig13481_at	CATTGCCACGCTGATGATGTTT	TCAATGGTGTAAATGCCCTCTGC
Contig2992_s_at	ACGGCCATTTGGTTCTGGAT	AAGTTTCGCTGGGTGTAGCA
Contig9152_at	GTCCAGGATGCCACGGACAA	GCAGGTTCAATGTTTACAGCGCAA
Contig12724_at	ATGTCCATTGCCTCGTTCCT	TGAACCTGACGAGTGGCTTA

Como gen control se empleó el gen constitutivo *ACTINA* de cebada (*Hv-Actin2*) mediante el uso de los siguientes cebadores (tabla 11):

Tabla 11.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Semicuantitativa correspondientes al gen constitutivo *ACTINA* de cebada (*Hv-Actin2*).

	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
<i>Hv-Actin2</i>	GGCTGACGGTGAGGACATCCAG	GCTCATTGTAGAAAGTGTGATGCCAG

3.3.4.2.- PCR-Semicuantitativa.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es una técnica que permite amplificar secuencias de DNA *in vitro*, por repetición de la reacción de síntesis de un fragmento de DNA, comprendido entre cebadores específicos mediante una DNA polimerasa.

Esta técnica permite estimar la cantidad de DNA de la muestra al compararla con un patrón. En este estudio se empleó el gen constitutivo *Hv-Actin2* para ajustar las concentraciones de los cDNA originales y para comparar las diferencias de expresión de los genes analizados, relacionadas con la cantidad de DNA total de las muestras.

Para la amplificación se realizó la mezcla de la reacción en un volumen final de 18µl, en una cabina de flujo vertical (Figura 13.a), para impedir posibles contaminaciones, y con material específico y estéril (Figura 13.b). La reacción se preparó tal como se detalla en la tabla 12, utilizando los siguientes reactivos:

- Cebadores de cadena sencilla sintéticos.
- dNTPs (DNA Polymerization Mix 20mM) de Amersham Bioscience.
- Buffer Taq (10x), MgCl₂ 50mM y Taq polimerasa (5u/µl) del kit “DNA polymerase” de Biotools.

Tabla 12.- Composición de la mezcla de la reacción para PCR- Semicuantitativa.

H ₂ O DEPC 13,66µl	x N° de reacciones	=	µl H ₂ O DEPC
Buffer 2µl	x N° de reacciones	=	µl buffer
MgCl ₂ (50mM) 0,34µl	x N° de reacciones	=	µl MgCl ₂
dNTPs (20mM) 0,2µl	x N° de reacciones	=	µl dNTPs
De cada Cebador 0,8µl	x N° de reacciones	=	µl cada Cebador
TAQ (5u/µl) 0,2µl	x N° de reacciones	=	µl TAQ

Para preparar la mix se tuvo en cuenta el número de reacciones, no obstante sumamos una reacción más, ya que al pipetear constantemente se tienen pérdidas. Se añadieron 18µl a cada tubo que contenía 2µl de cDNA (tiras de 8 tubos de 0,2ml de Thermo-Stripe de ABgene) (Figura 13.c) y a continuación se agregó una gota de aceite (Mineral Oil de Sigma).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de DNA Engine Peltier Thermal Cycler 4.0 (Bio Rad) (Figura 13.d).



Figura 13.- Condiciones y equipamiento para la técnica PCR Semicuantitativa; a) Cabina de flujo laminar vertical para evitar contaminaciones de DNA externo; b) Material estéril utilizado; c) Tiras de 8 tubos de 0,2ml donde se desarrollan las reacciones y d) El termociclador utilizado para la amplificación de DNA.

El programa utilizado para las amplificaciones se compone de las siguientes fases y se resume en la tabla 13:

Tabla 13.- Programa de amplificación para PCR-Semicuantitativa.

Fase 1	1 ciclo	94°C	2 min
Fase 2	33 ciclos	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 3em;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 94°C x°C 72°C </div> </div>	1 min 1 min 1 min
Fase 3	1 ciclo	72°C	10 min
Fase 4	1 ciclo	4°C	-----

- Fase 1: Desnaturalización del DNA a 94°C durante 2 min para la separación de las hebras de DNA.
- Fase 2: La reacción en cadena de la DNA-Polimerasa se realiza en tres etapas que constituyen un ciclo de amplificación (Figura 14) que se repite 33 veces consecutivas. El ciclo consta:
 - o Desnaturalización del DNA a 94°C durante 1min.

- Hibridación de las hebras simples de DNA de interés, con los cebadores durante 1min, a una temperatura que va a depender de la composición de bases, tamaño y concentración de los cebadores.
- Etapa de elongación a 72°C durante 1min, donde la DNA polimerasa sintetiza las nuevas cadenas empleando como sustrato los dNTPs.
- Fase 3: Elongación de las hebras sintetizadas a 72°C durante 10min.
- Fase 4: Mantenimiento de las muestras a 4°C.

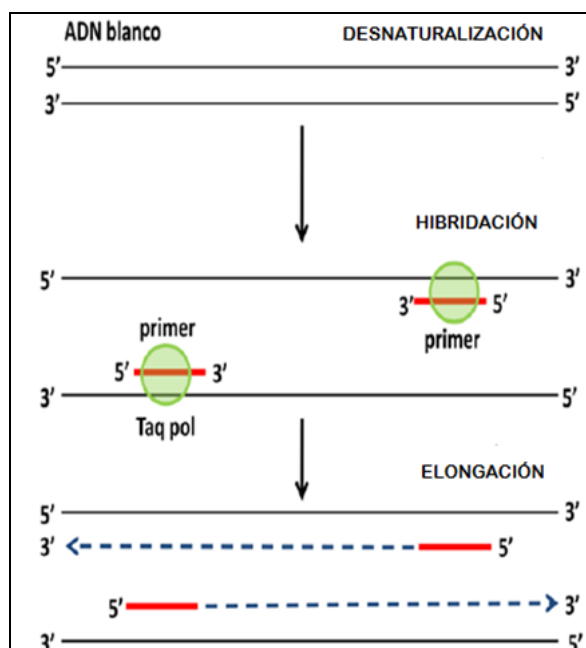


Figura 14.- Representación de las 3 etapas de un ciclo de amplificación. Fuente: www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/

Para visualizar los fragmentos de cDNA amplificados, se realiza una electroforesis en gel de agarosa (MS-12 Conda) en 1,5% tampón TBE 0,5x. Para la tinción de DNA se añadió el producto SYBR® DNA gel stain al 0,1% (Invitrogen). La mezcla de las muestras (15µl) y el tampón de muestra (2,5µl SB) se realizó en un papel Parafilm (Figura 15.a). La composición del SB es: glycerol (50%), bromophenol blue (0,25%) y Xylene cyanol (0,25%).

En los pocillos del gel se introdujeron las mezclas (Figura 15.b). Como marcador de peso molecular se utilizó el “100pb DNA Ladder” de Invitrogen.

La electroforesis se efectuó a 80V en el equipo E300 de Pharmacia Biotech durante 1h y 20min (Figura 15.c). Para la visualización del producto de amplificación se utilizó el programa Quantity One 4.6.7 con el trasiluminador con luz ultravioleta del Gel Doc 2.000 de Bio Rad (Figura 15.d).

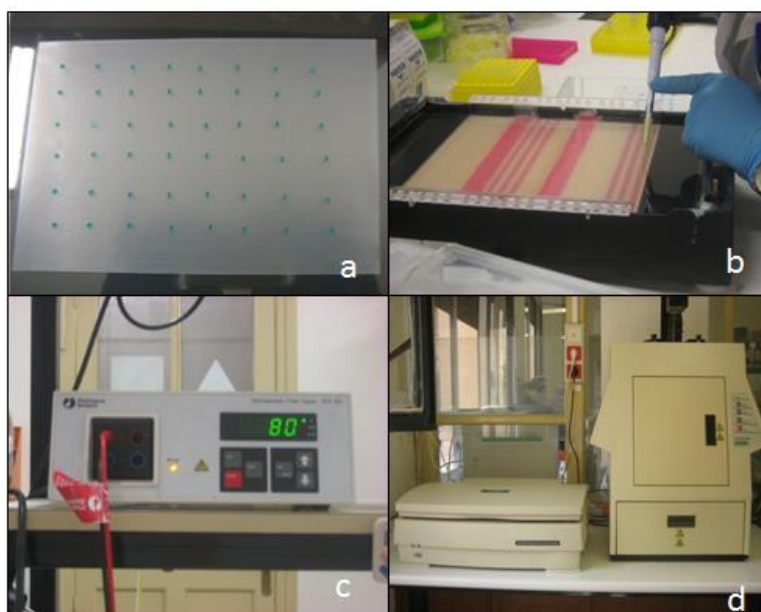


Figura 15.- Visualización de los productos de amplificación en geles de agarosa: a) Mezcla de la muestra con el buffer SB en un trozo de papel Parafilm; b) Introducción de 15µl de la mezcla, en los pocillos del gel de agarosa; c) La electroforesis se efectúa a 80V durante 1h y 20min y d) Gel-Doc de Bio-Rad con luz ultravioleta, para la visualización del producto amplificado.

3.3.5.- Amplificación de genes mediante PCR-Cuantitativa o en tiempo real.

3.3.5.1.- Diseño de Cebadores.

Para el diseño de cebadores correspondientes a los genes elegidos (Tabla 14), se partió de las secuencias de cDNA “consensus” contenidas en el programa HarVEST Barley V.1.74. Se diseñaron los cebadores mediante el programa Primers Express 3.0, siguiendo estos criterios:

- La longitud de los cebadores debe ser entre 15 y 30pb.
- La T_m debe estar entre 58-60°C. La diferencia de T_m entre los dos cebadores no debe ser superior a 2°C.
- El contenido de GCs debe estar entre 30-80%. Lo ideal, es que esté entre 40-60%.

- Se deben evitar las GCs en el extremo 3', de manera que las últimas cinco bases no contengan más de dos GCs.
- Es también importante evitar la complementariedad de bases en y entre los cebadores, para que no se formen bucles ("hairpins") en el cebador, y para evitar la formación de dímeros.
- El amplicón resultante debe ser pequeño, entre 50 y 150pb para aumentar la eficiencia de la PCR.

Los cebadores diseñados fueron sintetizados por Invitrogen. Se preparó una solución stock de 200µM y una dilución final de 20µM en H₂O mili Q.

Tabla 14.- Secuencias de los pares de cebadores diseñados para PCR-Cuantitativa. Se incluye las secuencias correspondientes al gen constitutivo GAPDH, que se empleó como gen control.

Probe	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Contig16389_at	CAATAGCAGAGGATGCAACGTATT	AATCCGCCTTGGGTGGTT
Contig16595_at	GCACTTCCTGGCCATCCA	GCCAGAAACCCACGCAACTA
Contig24914_at	ATCGCGGTTGAACCACTTG	CCTTCTCCTCAATGCTGCTATC
Contig7509_at	CCAGCAGGAGACCGAAACA	GCCTCATGAAGATGCTGACTCA
Contig938_s_at	AGAGCGGAAGCGGACAGA	ATGCTCTTCTTGATTTTGTGATGA
Contig9412_s_at	GACCAGCGAGGAGCTCATTT	AGCAGTGCAGACAGAACCATTG
Contig11071_at	GGCCTGCGGGAGACCTA	GGGCTCGCATGTCAACCT
GAPDH	GTGAGGCTGGTGCTGATTACG	TGGTGCAGCTAGCATTTGAGAC

3.3.5.2.- PCR-Cuantitativa.

La PCR-Cuantitativa o a tiempo real (qRT-PCR) se basa en la detección y cuantificación de cDNA mediante fluorescencia (Livak y Schmittgen 2001). El análisis de qRT-PCR se llevó a cabo en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Los reactivos utilizados fueron el kit "Fast SYBR® Green Master Mix de Applied Biosystems y el Rox (50x) Reference Dye de Invitrogen. Rox es un colorante que normaliza la señal de fluorescencia en qRT-PCR y permite reducir la desviación entre replicas debidas a la preparación de la reacción.

Las condiciones de amplificación fueron básicamente: 10min a 95°C para la desnaturalización, seguido de 40 ciclos de amplificación que constaban de 15s a 95°C para la desnaturalización y 1min a 60°C para la elongación, seguido de dos nuevos ciclos para la curva de melting o curva de la temperatura de fusión de 60-95°C.

Un detector realiza la medida de la cantidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo SYBR Green al amplificar el fragmento de cDNA en cada ciclo, concretamente durante la elongación a 60°C y durante el programa de la curva de melting, y la representa gráficamente (Dorak 2008) (Figura 16). Esto permite determinar el valor C_T , ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral que es inversamente proporcional a la cantidad inicial de producto (Dorak 2008).

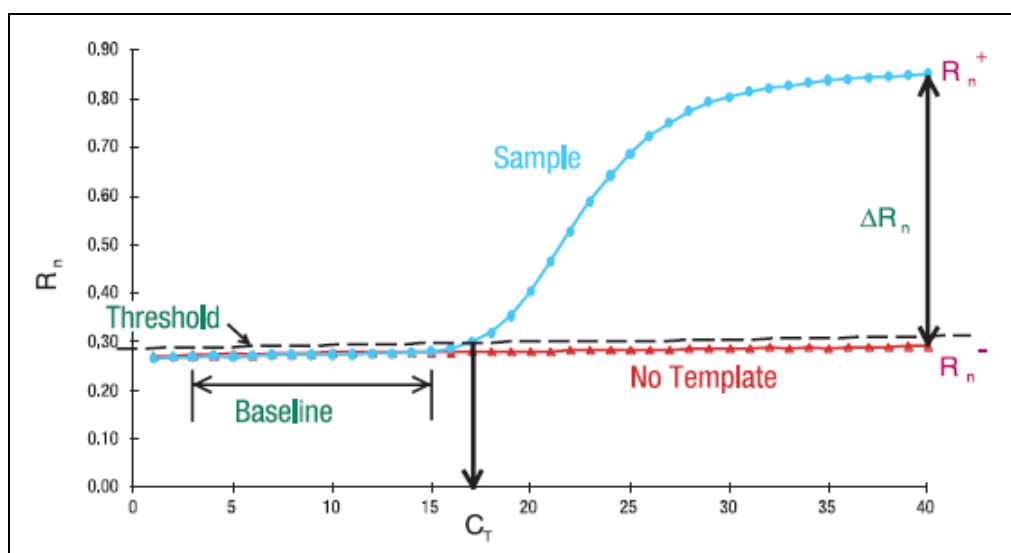


Figura 16.- Gráfica de amplificación en PCR-Cuantitativa. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada y el eje horizontal el número de ciclos. La Baseline o línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia y solo se detecta la fluorescencia basal. Threshold es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia y el corte entre el Threshold y la curva de amplificación determina el C_T o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación de la expresión génica. Fuente: Applied Biosystems.

Antes de iniciar los análisis de qRT-PCR fue necesario comprobar la validez de los cebadores diseñados según dos parámetros: formación de dímeros entre cebadores y eficiencia en la amplificación.

- Formación de dímeros entre cebadores.

Se define como “Primer Dimer” o dímeros entre cebadores, a la existencia de complementariedad de bases entre las secuencias de los cebadores, dando como resultado amplificaciones inespecíficas y una incorrecta cuantificación del producto en la PCR. Para la detección del parámetro se realizaron amplificaciones para cada uno de los pares de cebadores sin cDNA.

En una cabina de flujo vertical, se preparó la mezcla de la reacción en un volumen final de 20µl, tal como se detalla a continuación en la tabla 15.

Tabla 15.- Composición de la reacción para detectar dímeros entre cebadores.

Cebador Forward 1µl	x N° reacciones	=	µl Cebador Forward
Cebador Reverse 1µl	x N° reacciones	=	µl Cebador Reverse
Mix:			
Fast SYBR® Green Master Mix 10µl	x N° reacciones	=	µl Master Mix
Rox 0,4µl	x N° reacciones	=	µl Rox
H ₂ O MilliQ 7,6µl	x N° reacciones	=	µl H ₂ O Milli Q

Los componentes de la reacción se añadieron según el orden en la tabla. Se trabajó con dos réplicas técnicas con cada pareja de cebadores en placas de 96 pocillos (Figura 17.a) cubiertas por una lámina adhesiva (QPCR Adhesive Clear Seals 4titude). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de PCR-Cuantitativa (Figura 17.b).

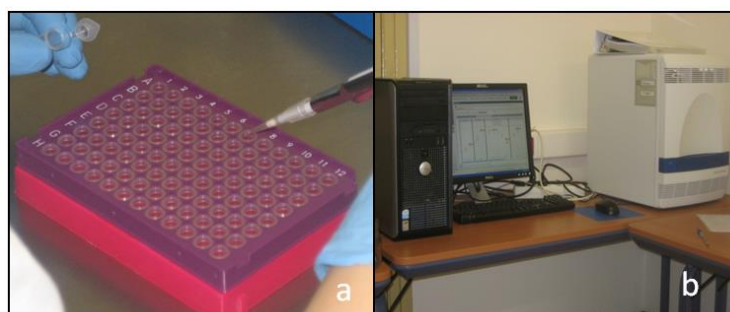


Figura 17.- Procedimiento de la técnica PCR-Cuantitativa: a) Placas específicas para PCR-Cuantitativa y b) Termociclador de PCR-Cuantitativa.

- Eficiencia de los cebadores.

Para estudiar la estabilidad en la amplificación por los cebadores independientemente de la concentración inicial de cDNA se analizó la eficiencia de los pares de cebadores.

Se realizaron diluciones a 1:1, 1:2, 1:4 y 1:6 de las muestras control (anteras a los 8 días de cultivo (8dc) de la línea DH6148 y a los 16 días de cultivo (16dc) de la línea DH6183). Para la amplificación de las muestras se realizó la siguiente reacción

(Tabla 16) en un volumen final de 20µl. Para el análisis se utilizaron placas de 96 pocillos tal como se ha descrito anteriormente.

Tabla 16.- Composición de la reacción para determinar la eficiencia de los cebadores.

Cebador Forward 1µl	x N° reacciones	=	µl Cebador Forward
Cebador Reverse 1µl	x N° reacciones	=	µl Cebador Reverse
cDNA 1µl	x N° reacciones	=	µl cDNA
Mix:			
Fast SYBR® Green Master Mix 10µl	x N° reacciones	=	µl Master Mix
Rox 0,4µl	x N° reacciones	=	µl Rox
H ₂ O MilliQ 6,6µl	x N° reacciones	=	µl H ₂ O Milli Q

Los valores C_T obtenidos en las distintas diluciones para cada pareja de cebadores se utilizaron para calcular la eficiencia (E) aplicando la siguiente fórmula (Paolacci y col. 2009).

$$E = (10^{\frac{-1}{m}} - 1) \times 100$$

Donde m es la pendiente de la recta de regresión obtenida entre el logaritmo de las diluciones utilizadas y el valor C_T para cada una de ellas. Solo se utilizaron los pares de cebadores con una eficiencia entre el 95-100%.

- Gen control y ajuste de muestras.

Para cuantificar las diferencias de expresión entre muestras, se empleó el método del C_T comparativo utilizando un gen constitutivo como control. El gen constitutivo fue el gen *GAPDH* (*GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO-DESHIDROGENASA*), el que presentaba una mayor eficiencia entre los genes constitutivos ensayados.

Las muestras de cDNA se diluyeron inicialmente a 1:5, pero se ajustaron finalmente sus diluciones teniendo en cuenta que las C_T de las muestras en amplificación del gen control se aproximaran entre ellas. Para los ajustes de dilución de las muestras y los posteriores análisis se utilizó la fórmula de reacción descrita en la tabla 16.

- Análisis de qRT-PCR.

Para los análisis se utilizaron dos réplicas biológicas de cada punto: anteras de las líneas DH6148 y DH6183 antes del tratamiento de estrés (c), después de 4 días de inducción por estrés (4dp), y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc, 16dc), a excepción de la muestra de 16 días de cultivo (16dc) de la línea DH6183 de la que solo se disponía de una réplica biológica. De cada replica biológica se analizaron dos replicas técnicas.

Se realizaron simultáneamente reacciones de qRT-PCR con el gen a analizar y el gen constitutivo. Para los cálculos de cuantificación de la expresión génica se utilizó el método C_T de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen 2001) (Applied Biosystems User Bulletin nº2).

Se tomaron las medias de los valores de C_T obtenidos en las replicas técnicas de cada gen en cada punto (C_{Tgen}) y se corrigieron respecto a los valores obtenidos en el gen control ($C_{Tcontrol}$). Se realizó una nueva corrección de los valores teniendo en cuenta el punto con mayor estabilidad entre replicas técnicas (pes) siendo P_0 ($C_{Tgenpes} - C_{Tcontrolpes}$). Finalmente se representaron gráficamente los valores medios de los obtenidos para cada replica biológica aplicando la siguiente fórmula:

$$2^{-(C_{Tgen} - C_{Tcontrol})_{punto} - P_0}$$

4.- RESULTADOS

4.1.- Caracterización de los genes seleccionados para este estudio.

Para este estudio se disponía de tres colecciones de genes asociados con los plástidos. Dos colecciones se habían seleccionado a partir de datos previos del grupo de trabajo:

- Colección EM: compuesta por 30 genes que se inducían en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora y estaban asociados al componente celular plastídico (Vallés y col. resultados no publicados).
- Colección QTL-Alb: compuesta por 17 genes localizados en regiones cromosómicas en las que se mapaban QTLs asociados al carácter de albinismo en cultivo de anteras de cebada (Muñoz-Amatriain y col. 2008).

La última colección (M-Alb) estaba compuesta por 20 genes que se seleccionaron del estudio de Svensson y col. (2006), ya que presentaban distinto nivel de expresión génica entre mutantes albinos de cebada.

Para asignar una funcionalidad a los distintos genes seleccionados, fue necesario, en primer lugar, determinar las homologías de secuencia de estos genes y otros genes conocidos utilizando la información recogida en distintas bases de datos, como UniProt de carácter general, MSU de arroz y TAIR de *Arabidopsis*, mediante el programa HarvEST Barley v.1.74. El criterio de similitud de secuencia fue de 9, en una escala de 1 a 11. En las tablas 17, 18 y 19 se muestran las homologías (Nº de entrada y descripción) que presentaron un mayor valor de similitud (e-value) en las bases de datos consultadas. Así mismo, se indica el acrónimo correspondiente a los genes identificados. A los genes que no presentaban homología con alguna de las secuencias conocidas se les asignó el acrónimo Hv-ALB correspondiente a *Hordeum vulgare*-Albinismo.

Tabla 17.- Homologías de secuencias de los genes de la colección EM, mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74. Se presenta la homología con mayor valor de similitud ("e- value") de las tres analizadas (UniProt (general), MSU (arroz), TAIR (*Arabidopsis*)), así como el acrónimo correspondiente.

Probe	Nº de entrada	e- value	Acrónimo	Descripción
Contig11738_at	UniRef90_P0C494	6,00E-68	RPS8	30S ribosomal protein S8
Contig1314_s_at	UniRef90_P00228	3,00E-74	Fd	Ferredoxin
Contig13277_at	UniRef90_Q2RBI6	1,00E-64	Hv-ALB1	Expressed protein
Contig14691_at	LOC_Os09g19850.1	3,00E-41	CRS1	Chloroplastic group IIA intron splicing facilitator
Contig14780_at	UniRef90_C5X156	8,00E-52	Hv-ALB2	Uncharacterized protein Sb01g008190
Contig16148_at	LOC_Os12g07880.1	7,00E-99	ARC5	Dynamin family protein
Contig16389_at	UniRef90_A2TIS2	1,00E-102	SBE	Putative starch branching enzyme
Contig16595_at	LOC_Os02g39740.1	1,00E-127	TAB	psaB translation factor
Contig17155_at	LOC_Os12g02380.1	1,00E-106	EF-P	Elongation factor P
Contig17319_at	LOC_Os01g31110.1	3,00E-41	CAF2	CRS2-associated factor 1
Contig19088_at	UniRef90_B9FI59	1,00E-82	Hv-ALB3	Putative uncharacterized protein
Contig2243_s_at	UniRef90_B7SKZ2	2,00E-48	BBI	Bowman-Birk type wound-induced protease inhibitor
Contig23344_at	LOC_Os10g32540.1	6,00E-52	Hv-ALB4	SAP domain containing protein
Contig23926_at	LOC_Os08g03560.2	5,00E-65	CHUP	Chloroplast unusual positioning protein
Contig24791_at	LOC_Os04g51280.1	3,00E-83	DAL	DAG protein
Contig24914_at	LOC_Os02g01440.1	2,00E-74	NOS1	Protein nitric oxide synthase 1
Contig25153_at	LOC_Os07g36250.3	3,00E-44	RF	Peptide chain release factor protein
Contig26034_at	LOC_Os11g39670.1	0.0	SRS	Seryl-tRNA synthetase
Contig4380_s_at	LOC_Os05g01110.1	2,00E-52	RPL28	50S ribosomal protein L28
Contig5004_at	LOC_Os07g38300.1	1,00E-120	RRF	Ribosome recycling factor
Contig5708_at	UniRef90_B6T2D1	4,00E-45	PSRP4	Plastid-specific 30S ribosomal protein 4
Contig6640_at	LOC_Os11g37990.1	1,00E-156	CRM	Chloroplastic group IIA intron splicing facilitator CRS1
Contig6817_at	LOC_Os01g17150.1	2,00E-42	PSRP5	Plastid-specific 50S ribosomal protein 5
Contig7509_at	LOC_Os08g04450.3	1,00E-103	DAG	DAG protein
Contig8790_at	LOC_Os01g71000.1	0.0	PK1B	Protein kinase APK1B
Contig9121_at	LOC_Os05g07870.1	0.0	PPT	Triose phosphate/phosphate translocator, non-green plastid
Contig938_s_at	LOC_Os11g18947.2	6,00E-88	RHB1A	Zinc finger, C3HC4 type domain containing protein
Contig9412_s_at	UniRef90_B6U7U0	1,00E-138	RLUB	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B
HVSMEb0007O01f_at	LOC_Os04g16874.1	0.0	PSBC	Photosystem II 44 kDa reaction center protein
HVSMEb0013I03r2_at	LOC_Os05g51150.3	2,00E-57	SIG	RNA polymerase sigma factor

Tabla 18.- Homologías de secuencias de los genes de la colección QTLs, mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74. Se presenta la homología con mayor valor de similitud ("e- value") de las tres analizadas (UniProt (general), MSU (arroz), TAIR (*Arabidopsis*)), así como el acrónimo correspondiente.

Probe	Nº de entrada	e- value	Acrónimo	Descripción
Contig4499_s_at	LOC_Os02g01030.2	1,00E-180	TPR	Tetratricopeptide repeat domain containing protein
Contig2515_at	LOC_Os02g01150.2	0.0	HPR	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase domain containing protein
Contig7192_at	UniRef90_Q6YU89	0.0	UPL	Putative HECT ubiquitin-protein ligase 3
Contig7090_s_at	LOC_Os02g01280.1	0.0	TCP	T-complex protein
Contig2278_at	UniRef90_Q8RVZ8	0.0	FNR	Ferredoxin--NADP reductase
Contig6276_s_at	UniRef90_Q40009	2,00E-88	ABA7	18,9 kDa ABA-induced protein
Contig12110_s_at	LOC_Os03g61640.1	1,00E-102	ZOS3-23	ZOS3-23 - C2H2 zinc finger protein
Contig4021_at	UniRef90_A1YJE1	7,00E-71	ZIM	ZIM motif-containing protein
Contig9559_at	UniRef90_Q4R1A9	0.0	CAX	Cation/H ⁺ exchanger
Contig4586_at	LOC_Os07g29620.1	0.0	SCP39	Putative Serine Carboxypeptidase homologue 39
Contig4470_s_at	UniRef90_Q8GT63	0.0	INV	Extracellular invertase
Contig6695_at	LOC_Os09g34100.1	5,00E-20	MBL	Metallo-beta-lactamase
Contig11071_at	LOC_Os09g34310.3	4,00E-36	Hv-ALB5	Expressed protein
Contig8361_at	LOC_Os09g34910.1	1,00E-113	DDX	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7
SNP 6170-304	LOC_Os09g35630	4,00E-99	BAG	BAG domain-containing protein
Contig6598_at	LOC_Os09g35810.1	1,00E-133	NC	NC domain-containing protein
Contig9219_at	LOC_Os10g01134.1	0.0	SCP46	Serine Carboxypeptidase homologue

Tabla 19.- Homologías de secuencias de los genes de la colección M-Alb, mediante el programa HarvEST Barley v. 1.74. Se presenta la homología con mayor valor de similitud (“e- value”) de las tres analizadas (UniProt (general), MSU (arroz), TAIR (*Arabidopsis*)), así como el acrónimo correspondiente.

Probe	Nº de entrada	e- value	Acrónimo	Descripción
HV_CEb0002J23r2_s_at	UniRef90_Q70DK2	2,00E-95	PcL	Blue copper binding protein
Contig2742_at	LOC_Os01g69250.1	1,00E-88	TOM20	Mitochondrial import receptor subunit TOM20
Contig7944_at	UniRef90_B8ZWH5	0.0	PHT6	Phosphate transporter
Contig12692_s_at	LOC_Os04g51520.1	1,00E-102	GH16	Protein glycosyl hydrolases family 16
Contig10615_at	LOC_Os03g07400.1	5,00E-42	Hv-ALB6	Expressed protein
Contig9813_at	LOC_Os02g52040.1	1,00E-54	EXO	Phosphate-induced protein 1
Contig1800_at	UniRef90_Q43210	0.0	PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
Contig4811_s_at	LOC_Os04g48230.2	0.0	DYR	Dehydration response related protein
Contig2721_at	LOC_Os02g28980.1	0.0	PPIA	Peptidyl-prolylisomerase
Contig418_at	UniRef90_P04784	1,00E-143	WCAB-1	Chlorophyll a-b binding protein
Contig5059_s_at	UniRef90_Q8L827	1,00E-142	RNS	RNase S-like protein
Contig14378_at	LOC_Os12g18650.7	1,00E-80	RCC	Regulator of chromosome condensation
HV09F14u_at	LOC_Os12g14440.1	2,00E-07	JRL	Jacalin-like lectin
Contig3221_at	UniRef90_P31093	8,00E-77	PSAN	Photosystem I reaction center subunit N
Contig828_s_at	UniRef90_P04784	1,00E-145	WCAB-2	Chlorophyll a-b binding protein
Contig19438_at	LOC_Os04g36720.1	1,00E-115	FRO	Ferric-chelate reductase
Contig13481_at	LOC_Os06g40500.1	1,00E-111	Hv-ALB7	Expressed protein
Contig2992_s_at	UniRef90_Q9LEH7	1,00E-141	CHIT	Chitinase II
Contig9152_at	UniRef90_Q8H0Q4	2,00E-71	COR14b	Cor14b protein
Contig12724_at	LOC_Os03g03034.4	1,00E-136	FLS	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase

Al estudiar los procesos en los que intervenían los genes seleccionados, se pudo determinar que la mayor parte de los genes de la colección EM estaban asociados a mecanismos ligados a la regulación de la expresión génica, mientras que en la colección QTL-Alb predominaban los genes asociados a la regulación celular, en particular por regulación proteica. Finalmente en la colección M-Alb predominan los genes asociados a la fotosíntesis y a la respuesta al estrés.

4.2.- Comparación de la expresión génica entre hojas albinas y verdes de plantas obtenidas en cultivo de anteras.

La existencia de unos porcentajes altos de albinismo en el cultivo de anteras no se hace visible hasta que se regeneran las plántulas. Por ello, para determinar qué genes de las tres colecciones permitían diferenciar materiales albinos de verdes, se estudiaron los niveles de expresión de dichos genes en hojas albinas y verdes de plántulas regeneradas de cultivo de anteras. Para este estudio se seleccionaron tres variedades Vanessa, Siberia y Static, que aunque presentaban distintas características agronómicas y respuesta al cultivo de anteras (Apartado 3.1.1, tabla 4), coincidían en que menos del 12% de las plántulas regeneradas eran verdes.

Para realizar los análisis de expresión génica se realizaron amplificaciones por PCR- Semicuantitativa. Para ello, se extrajo el RNA de las muestras de hojas y se sintetizó el cDNA. Con el cDNA se realizaron las amplificaciones, utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes seleccionados (Apartado 3.3.4.1, tabla 8, 9, 10 y 11). Se empleó como gen control el gen *Hv-Actin2*. Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa.

Al caracterizar la expresión génica de los 67 genes de las tres colecciones (Anexo II) se observó que aunque muchos genes presentaban diferencias significativas en su nivel de expresión entre hoja verde y albina en alguna variedad, muchas veces estas diferencias no eran consistentes entre las variedades estudiadas. Únicamente 15 genes presentaban patrones de expresión que los hacían candidatos para posteriores estudios (*WCAB-2*, *WCAB-1*, *PSAN*, *RHB1A*, *SBE*, *RNS*, *JRL*, *SIG*, *NOS1*, *RRF*, *RLUB*, *DAG*, *TAB*, *RPL28* y *Hv-ALB5*).

Las homologías de secuencia de estos genes (Apartado 4.1, tabla 17,18 y 19) nos determinaron sus funciones (Tabla 20) que estaban relacionadas con fotosíntesis (*WCAB-2*, *WCAB-1*, *PSAN*, *RHB1A* y *SBE*), respuesta al estrés (*RNS* y *JRL*), expresión génica (*SIG*, *NOS1*, *RRF*, *RLUB*, *DAG*, *TAB* y *RPL28*) y el gen *Hv-ALB5* de función desconocida.

Tabla 20.- Homologías de secuencias de los 15 genes seleccionados como genes candidatos para posteriores estudios, con sus acrónimos correspondientes y agrupados por su función general.

Acrónimo	Descripción	Función general
WCAB-2	Chlorophyll a-b binding protein	Fotosíntesis
WCAB-1	Chlorophyll a-b binding protein	Fotosíntesis
PSAN	Photosystem I reaction center subunit N	Fotosíntesis
RHB1A	Zinc finger, C3HC4 type domain containing protein	Fotosíntesis
SBE	Putative starch branching enzyme	Fotosíntesis
RNS	RNase S-like protein	Respuesta al estrés
JRL	Jacalin-like lectin	Respuesta al estrés
SIG	RNA polymerase sigma factor	Expresión génica
NOS1	Protein nitric oxide synthase 1	Expresión génica
RRF	Ribosome recycling factor	Expresión génica
RLUB	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	Expresión génica
DAG	DAG protein	Expresión génica
TAB	psaB translation factor	Expresión génica
RPL28	50S ribosomal protein L28	Expresión génica
Hv-ALB5	Expressed protein	-

Cuando estudiamos los patrones de expresión en hoja albina y verde de los 15 genes seleccionados (Figura 18), observamos que 12 genes (*WCAB-2*, *WCAB-1*, *PSAN*, *RHB1A*, *SBE*, *RNS*, *JRL*, *SIG*, *NOS1*, *RRF*, *RLUB* y *Hv-ALB5*) mostraban una diferencia de expresión clara entre hojas albinas y verdes en las variedades Vanessa, Siberia y Static. En los 3 genes restantes (*DAG*, *TAB* y *RPL28*) aunque se observaron diferencias entre hojas albinas y verdes, estas diferencias no eran consistentes. Sin embargo, estos tres genes determinaban diferencias claras de patrón de expresión entre variedades.

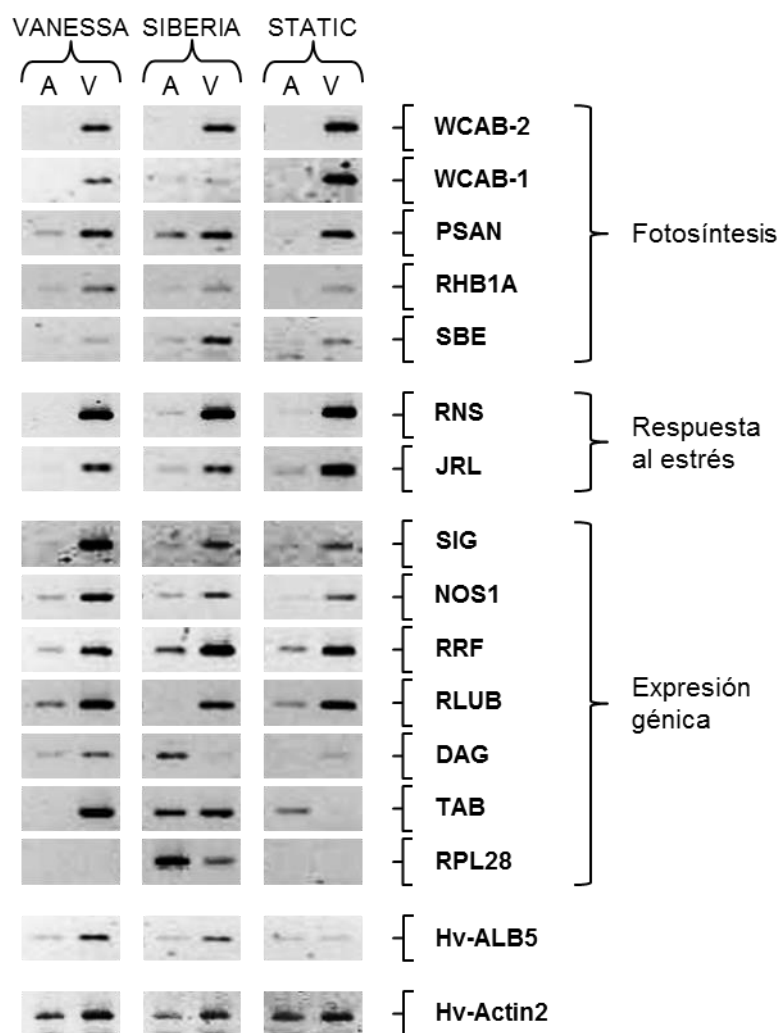


Figura 18.- Análisis de expresión de los 15 genes seleccionados, mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*.

Entre los genes asociados a funciones fotosintéticas, *WCAB-2* es el que presentó una mayor diferencia en el nivel de expresión entre hojas albinas y verdes. Los dos genes relacionados con la respuesta al estrés (*RNS* y *JRL*) así como de los genes asociados a expresión génica (*SIG*, *NOS1*, *RRF* y *RLUB*) también mostraban diferencias de expresión entre hojas verdes y albinas en las tres variedades. Como ya habíamos indicado, el resto de los genes asociados a expresión génica (*DAG*, *TAB* y *RPL28*) mostraron unas diferencias claras de patrón de expresión entre las variedades. Así, *DAG* en el genotipo Siberia mostró una mayor expresión en la hoja albina al contrario que en las otras dos variedades. *TAB* mostró una expresión distinta en cada variedad: en Vanessa se expresó en hoja verde, en Siberia de forma semejante en hoja albina y verde, y en Static se expresó en hoja albina. El gen *RPL28*

sólo se expresó en Siberia, pero más en hoja albina que en hoja verde. Finalmente, el gen de función desconocida *Hv-ALB5* se expresó más en hoja verde en los genotipos Vanessa y Siberia, mientras que en Static la expresión era baja en los dos tipos de hojas.

4.2.1.- Comparación de los perfiles de expresión génica en cultivo de anteras de las líneas DH6148 y DH6183.

En el grupo de trabajo se disponía de una población de líneas casi isogénicas, diseñadas para la identificación de QTLs asociados al albinismo en cultivo de anteras de cebada. Entre estas líneas se habían intentado minimizar las diferencias en la respuesta a cultivo de anteras excepto las asociadas al albinismo.

El análisis de los perfiles de expresión de los 15 genes seleccionados en dos de las líneas de esta población con porcentajes de albinismo muy distintos, nos permitirá identificar diferencias de expresión ligadas al albinismo en fases iniciales del cultivo de anteras en las que no es posible distinguir entre los materiales que darán lugar a plantas verdes o albinas. Así, las diferencias en los perfiles de expresión nos permitirán determinar que mecanismos están implicados en el albinismo en las primeras fases del cultivo de anteras.

Las líneas seleccionadas fueron; la línea DH6148 con un solo un 4,17% de albinismo y la línea DH6183 con un 87,49% (Apartado 3.1.1, tabla 3). De estas líneas se tomaron anteras correspondientes a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp), fase en la que se produce el cambio en el patrón de desarrollo de las microsporas, y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc), que corresponden a las fases iniciales del desarrollo embriogénico hasta que las estructuras embrionarias están ya diferenciadas. Se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA de cada una de las muestras. Con el cDNA se realizaron las amplificaciones por PCR- Semicuantitativa y visualización en geles de agarosa, utilizando los cebadores de los 15 genes seleccionados. Se empleó como control el gen constitutivo *Hv-Actin2*.

En la figura 19 se muestran los resultados de la PCR- Semicuantitativa de los genes relacionados con la fotosíntesis.

FOTOSÍNTESIS

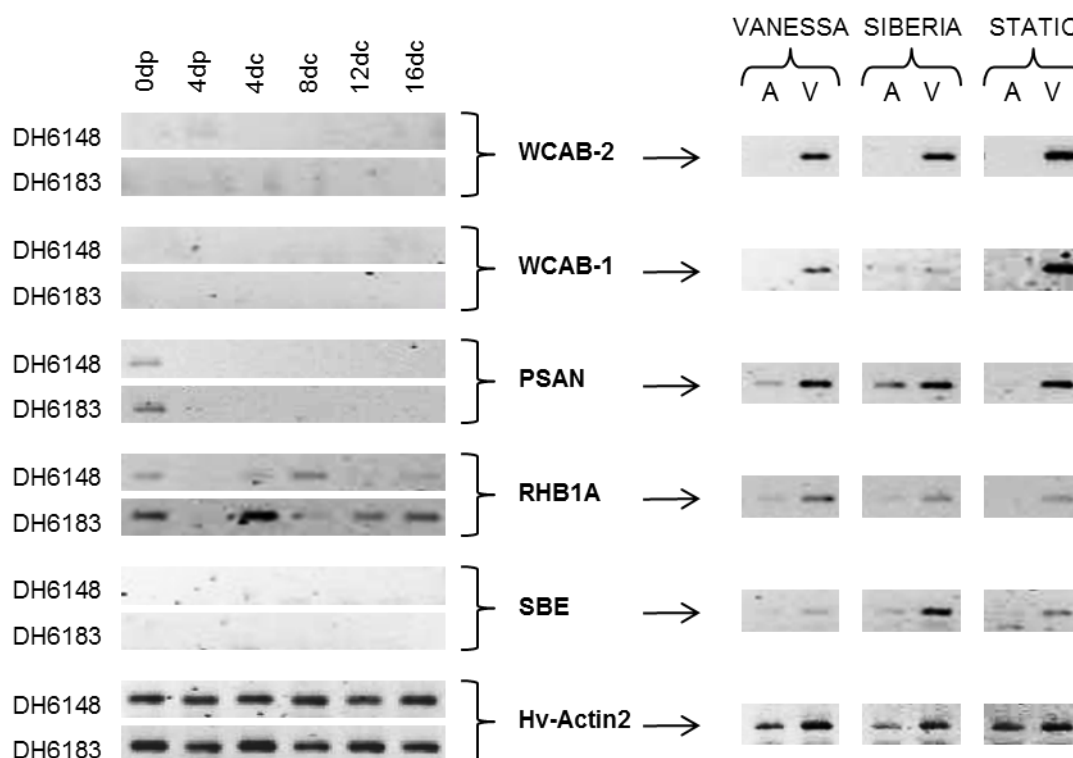


Figura 19.- Perfiles de expresión de los 5 genes relacionados con la fotosíntesis, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

De los 5 genes analizados *WCAB-2*, *WCAB-1* y *SBE* no se expresaron a lo largo del cultivo de anteras. El gen *PSAN*, en las dos líneas únicamente se expresó en las anteras antes de iniciar el tratamiento de estrés (0dp). Solo el gen *RHB1A* se expresaba a lo largo del cultivo y mostraba diferencias significativas entre las líneas. Así, el gen *RHB1A* que se expresaba en 0dp, baja su expresión después del tratamiento de estrés (4dc) y se induce de nuevo en 4dc en ambas líneas. En la línea menos albina (DH6148) su expresión decaía de nuevo a los 12dc, mientras que en la línea albina (DH6183) se mantenía hasta los 16dc.

Al estudiar el perfil de expresión de los genes asociados con la respuesta al estrés (Figura 20), se observó que el gen *RNS* no se expresaba a lo largo del proceso,

mientras que el gen *JRL* lo hacía en cada una de las fases con variaciones en el nivel de expresión, siendo más intenso a los 8-12dc.

RESPUESTA AL ESTRÉS

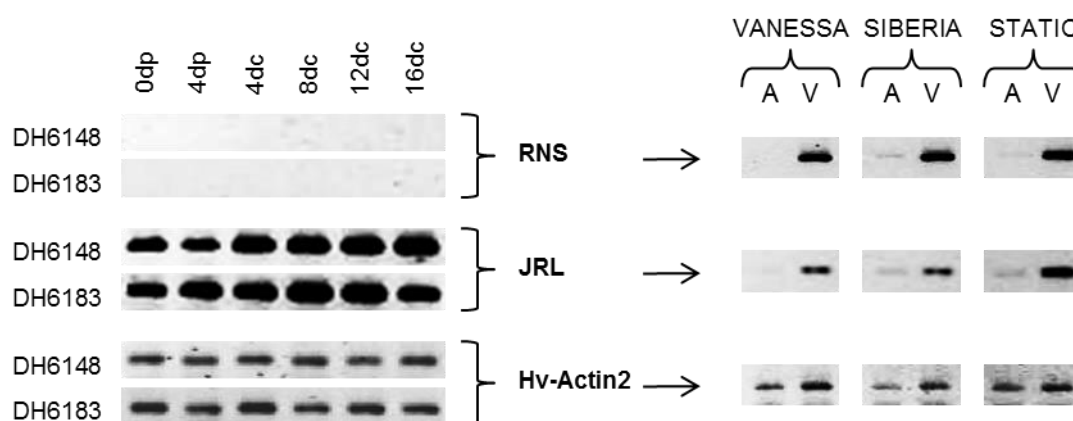


Figura 20.- Perfiles de expresión de los genes relacionados con la respuesta al estrés, analizados mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

En los resultados de la PCR- Semicuantitativa de los genes vinculados a la expresión génica relacionada con plástidos (Figura 21) se observan diferencias significativas entre líneas en los perfiles de expresión de algunos de los genes.

EXPRESIÓN GÉNICA

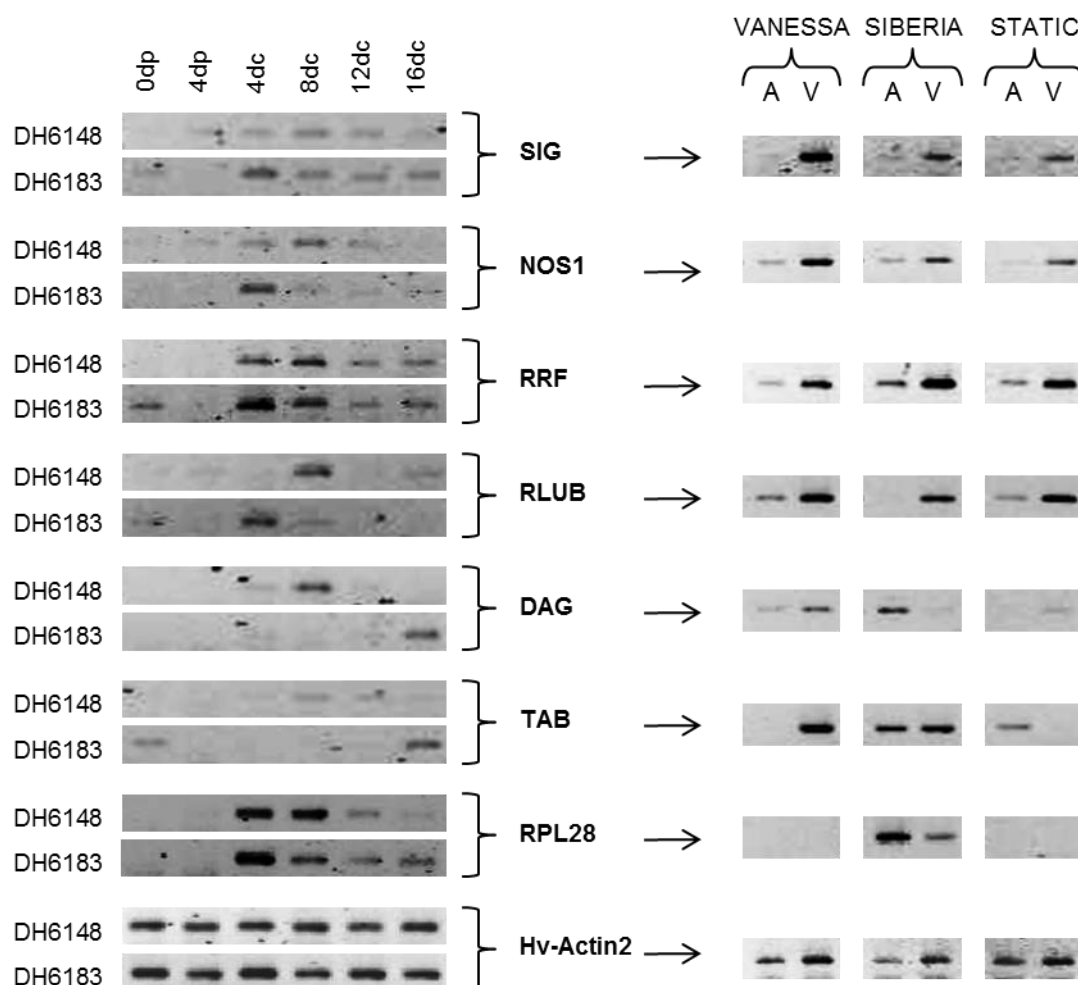


Figura 21.- Perfiles de expresión de los 7 genes relacionados con la expresión génica en plástidos, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

De los cuatro genes que habían mostrado una diferencia clara de expresión entre las hojas albinas y verdes en las tres variedades estudiadas, los genes *SIG* y *RRF* mostraban un perfil de expresión semejante. Este perfil se caracterizaba por su expresión a los 0dp únicamente en la línea más albina (DH6183) y por su disminución de la expresión después del tratamiento, inducción a los 4dc y expresión hasta los 16dc en ambas líneas.

Los otros dos genes (*NOS1* y *RLUG*) presentan diferencias marcadas entre los perfiles de expresión en las líneas. El gen *NOS1* se expresa de los 4dp a los 12dc en la línea menos albina, mientras que en la línea DH6183 se induce fuertemente a los 4dc y luego decae su expresión. El gen *RLUB* se inducía a los 4dc en la línea más albina pero lo hacía a los 8dc en la línea DH6148.

Entre los genes que mostraban diferencias de expresión entre las variedades en hojas verdes y albinas, los genes *DAG* y *TAB* presentaban un perfil de expresión semejante y con diferencias entre líneas. Así, *DAG* y *TAB* en la línea DH6148 se inducían a los 4dc-8dc aunque con mayor nivel de expresión a los 8dc, mientras que en la línea DH6183 no se inducían hasta los 16dc. Por último, el gen *RPL28* no mostró diferencias entre líneas, activándose a los 4dc y decayendo a lo largo del cultivo con más rapidez en la línea DH6148.

Finalmente, el gen *Hv-ALB5* de función desconocida es el gen que presentó una mayor diferencia de expresión entre líneas (Figura 22), ya que en la línea menos albina (DH6148) únicamente se detectó una expresión muy débil a los 4dp y 8dc, mientras que en la línea albina DH6183 se observó una inducción fuerte a los 4dc y 16dc.

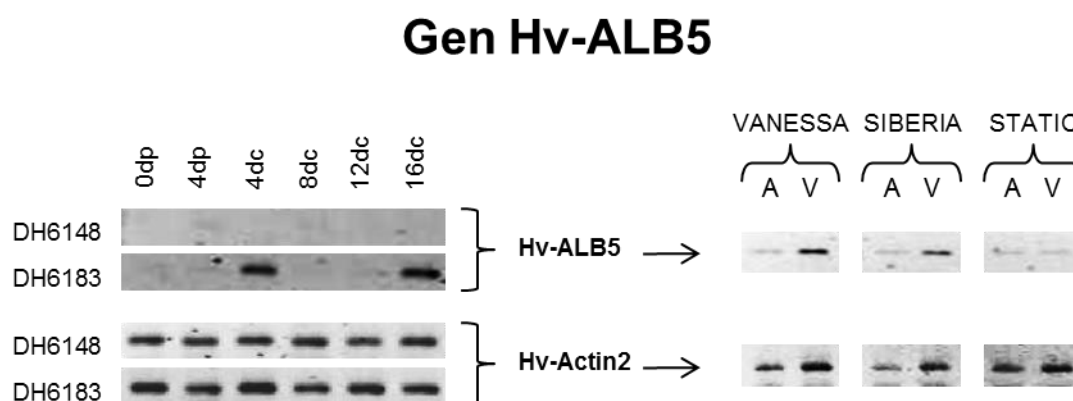


Figura 22.- Perfil de expresión del gen *Hv-ALB5* de función desconocida, analizada mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

4.2.2.- Comparación de los perfiles de expresión génica en cultivo de anteras de las variedades Orelie, Volley y Riviera.

Una vez caracterizado el perfil de expresión de los genes candidatos en las fases iniciales del cultivo de anteras en dos líneas casi isogénicas con diferencias extremas en el porcentaje de albinismo, se planteó la validación de las diferencias en los perfiles de expresión asociados al albinismo en variedades de cebada con distinta respuesta en el cultivo de anteras y distinto porcentaje de albinismo. Así para este estudio se seleccionaron tres variedades de cebada Orelie, Volley y Riviera (Apartado 3.1.1, tabla 4). Orelie es la variedad más eficiente en cultivo de anteras y presenta un porcentaje muy bajo de albinismo (2,87%), Volley aunque es la peor en cuanto a respuesta general, destaca por la ausencia de albinismo (0%), finalmente, Riviera se comporta de manera intermedia en cuanto a su respuesta al cultivo, pero se caracteriza por su alto porcentaje de albinismo (92,59%).

Para la caracterización del perfil de expresión de los 15 genes seleccionados, se tomaron anteras correspondientes a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp), fase en la que se produce el cambio en el patrón de desarrollo de las microsporas, y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc), que corresponden a las fases iniciales del desarrollo embriogénico de la microspora. Se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA de las anteras. Con el cDNA se realizaron las amplificaciones por PCR- Semicuantitativa y visualización en geles de agarosa, utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes (Apartado 3.3.4.1, tabla 8, 9, 10 y 11). Se empleó como gen control *Hv-Actin2*.

Cuando se estudió el perfil de expresión de los genes asociados con la fotosíntesis (Figura 23), se observó que los genes *WCAB-2*, *WCAB-1* y *PSAN* no se expresaban a lo largo del cultivo de anteras o solo lo hacían en anteras antes del tratamiento de estrés (0dc), tal como se había observado en el estudio de las líneas DHs.

FOTOSÍNTESIS

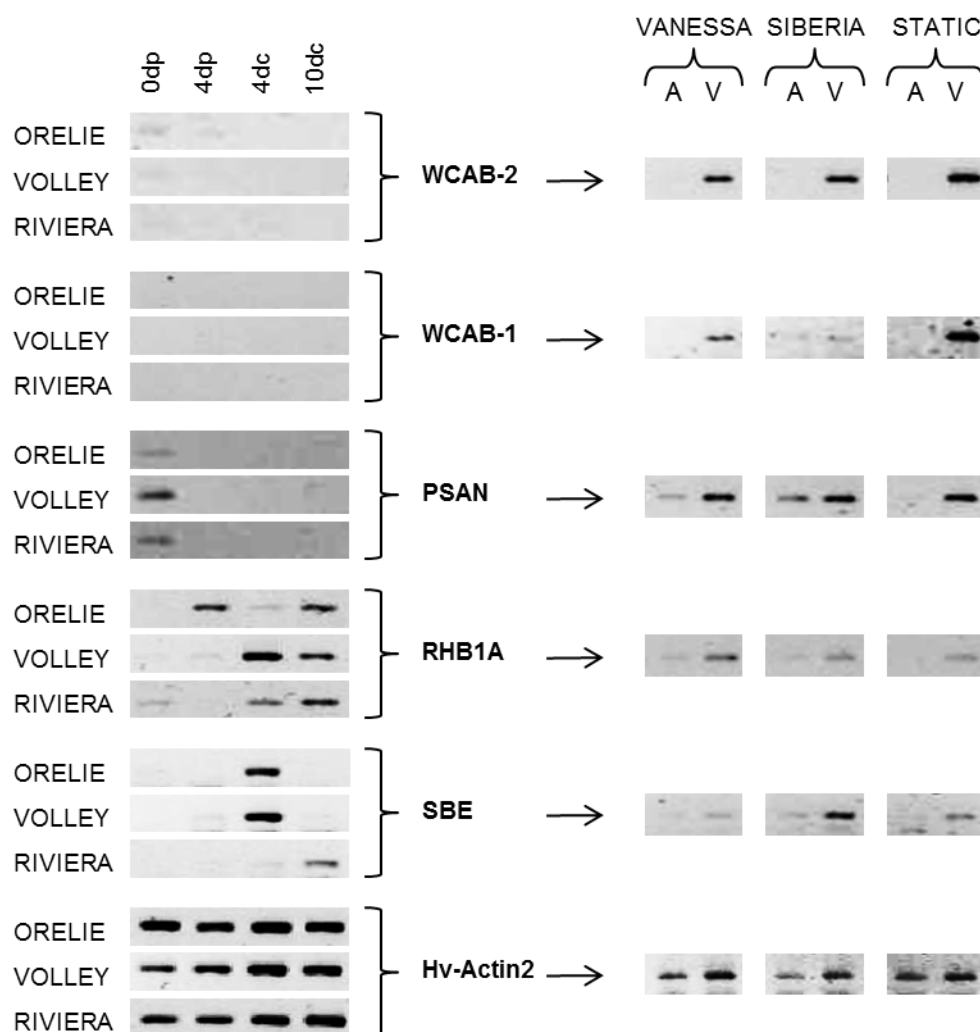


Figura 23.- Perfiles de expresión de los 5 genes relacionados con la fotosíntesis, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

Sin embargo, los genes *RHB1A* y *SBE* mostraban distinto patrón de expresión entre las variedades durante el cultivo de anteras. El gen *RHB1A*, en la variedad Orelie se inducía después del tratamiento de estrés (4dp) y de nuevo se expresaba a los 10dc, sin embargo en las variedades Volley y Riviera se expresaba a los 4dc y 10dc. Finalmente, el gen *SBE* mostró un perfil de expresión diferenciado entre las dos variedades con menor porcentaje de albinismo y la variedad albina. Así mientras que

en Orelie y Volley se indujo de forma específica a los 4dc, en Riviera lo hizo a los 10dc.

Cuando estudiamos el perfil de expresión mediante PCR- Semicuantitativa de los genes asociados con la respuesta al estrés (Figura 24), solo se observan diferencias significativas entre las tres variedades en el gen *RNS*, aunque de forma muy débil. Mientras que en Orelie y Riviera, *RNS* muestra una ligera expresión a los 0dp, que en Orelie parece mantenerse hasta 4dc y en Riviera vuelve a observarse a los 10dc, en Volley no se expresa. El gen *JRL* se expresa en estas fases del cultivo de anteras en las tres variedades, aunque con pequeñas variaciones en cuanto a los puntos de mayor expresión.

RESPUESTA AL ESTRÉS

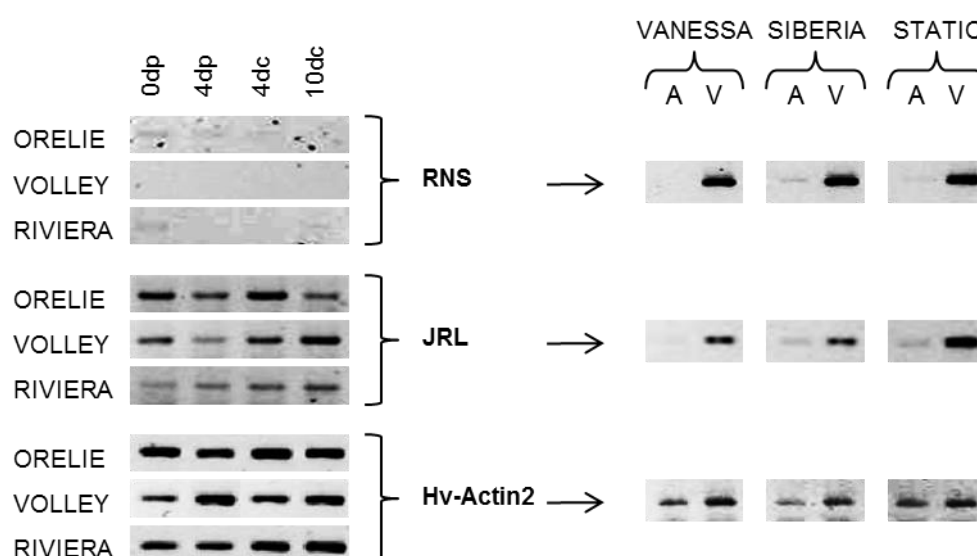


Figura 24.- Perfiles de expresión de los 2 genes relacionados respuesta al estrés, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

En la figura 25 se muestran los perfiles de expresión de los genes asociados a la expresión génica relacionada con plástidos. Entre los genes *SIG*, *NOS1*, *RRF* y *RLUB* que habían presentado una diferencia de expresión clara entre hojas albinas y

verdes, se observó que los genes *SIG* y *NOS1* presentaban el mismo perfil de expresión a lo largo del cultivo de anteras en las tres variedades. Ambos se inducen débilmente después del pretratamiento de estrés (4dp), pero tienen su máxima expresión a los 4dc en las variedades Orelie y Volley, y en 10dc en la variedad Riviera. Sin embargo, los genes *RRF* y *RLUB*, mostraron diferencias significativas en los perfiles de expresión entre las variedades. Mientras que *RRF* se expresaba en Orelie a lo largo de todo el proceso, en Volley y Riviera se inducía a los 4dc. *RLUB* por el contrario, se inducía en 4dc en las variedades con bajo porcentaje de albinismo, mientras que en Riviera se expresaba en todos los puntos.

Al estudiar los perfiles de expresión de los genes *DAG*, *TAB* y *RPL28*, que no habían mostrado una asociación clara con el albinismo en muestras de hojas pero si diferencias entre variedades, observamos que *DAG* y *TAB* presentaron perfiles de expresión semejantes en las tres variedades durante el cultivo. Sin embargo *RPL28*, en Volley y Riviera se inducía en 4dc, mientras que en Orelie se expresaba en todo el proceso con mayor inducción en 0dp y 10dc.

EXPRESIÓN GÉNICA

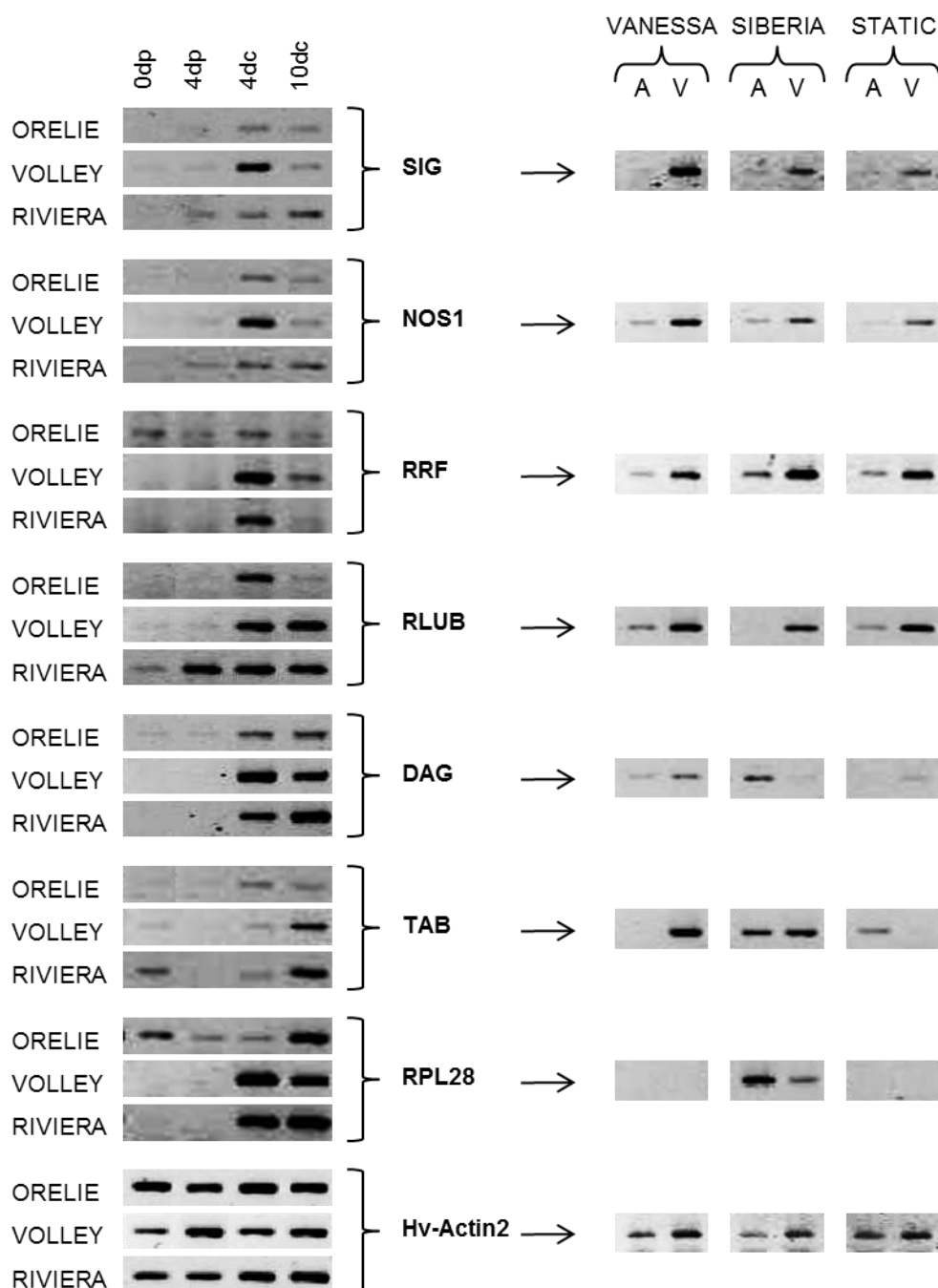


Figura 25.- Perfiles de expresión de los 7 genes relacionados con la expresión génica en plástidos, analizados mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

Finalmente, en la figura 26 se muestra el resultado del análisis del perfil de expresión del gen *Hv-ALB5*. Aunque este gen presentaba diferencias claras de expresión entre las líneas DHs, en cultivo de anteras no muestra diferencias significativas entre las tres variedades. *Hv-ALB5* se induce en 4dp siendo su máxima expresión en 4dc en Orelie, en 10dc en Volley y en 4dp y 10dc en Riviera.

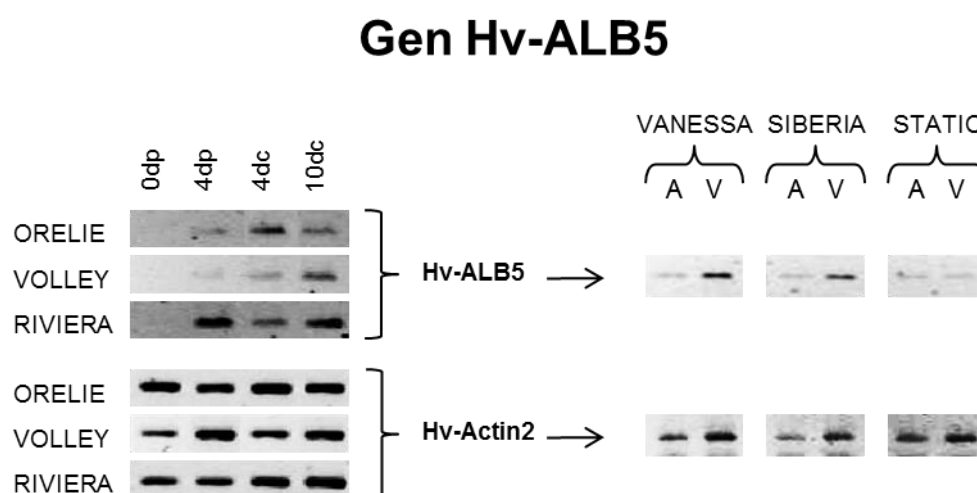


Figura 26.- Perfiles de expresión del gen *Hv-ALB5* de función desconocida, analizados mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa. A la izquierda de la imagen, los patrones de expresión en las fases iniciales del cultivo de anteras. Las muestras corresponden a 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. A la derecha se muestran los patrones obtenidos anteriormente en muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Gen constitutivo *Hv-Actin2*.

4.3.- Análisis de la expresión de los genes candidatos mediante PCR- Cuantitativa.

Una vez caracterizados por PCR- Semicuantitativa los perfiles de expresión de los 15 genes en las primeras fases del cultivo de anteras en dos tipos de muestras distintas, se observó que solo unos pocos genes mostraban diferencias de expresión entre líneas o variedades con distinto porcentaje de albinismo, y en algunos casos las diferencias eran débiles (Tabla 21).

Tabla 21.- Genes que muestran diferencias de expresión entre materiales verdes y albinos en cultivo de anteras.

Acrónimo	Diferencias de expresión entre material verde y albino		
	Hojas verde y albina de variedades	Cultivo de anteras de líneas DHs	Cultivo de anteras de variedades
RHB1A	Si	Si	No
SBE	Si	No	Si
NOS1	Si	Si	Si
RLUB	Si	Si	Si
DAG	No	Si	No
TAB	No	Si	No
Hv-ALB5	Si	Si	No

Para clarificar los perfiles de expresión de los genes que mostraban diferencias más significativas, se inició un estudio del perfil de expresión de estos genes mediante PCR- Cuantitativa en las líneas DH6148 y DH6183.

4.3.1.- Establecimiento de las condiciones para PCR- Cuantitativa.

- Formación de dímeros entre cebadores.

A partir de la secuencias de cDNA de los genes seleccionados, se diseñaron los cebadores para PCR- Cuantitativa (Apartado 3.3.5.1, tabla 14). Para establecer la ausencia de interacciones entre las secuencias de los cebadores y por tanto evitar amplificaciones inespecíficas, se realizaron reacciones de amplificación tal como se indica en el apartado 3.3.5.2 (Formación de dímeros entre cebadores). No se apreciaron dímeros en ninguna de las combinaciones de cebadores ensayadas.

- Eficiencia de los cebadores.

Para estudiar la eficiencia de los cebadores correspondientes a los genes seleccionados, se utilizaron distintas muestras de cDNA. Para el gen *Hv-ALB5* se utilizaron diluciones de cDNA, de 1, 1:2, 1:4 y 1:6 de anteras a 16dc, de la línea DH6183. Para el resto de cebadores se hicieron las mismas diluciones del cDNA de anteras a 8dc de la línea DH6148. Las reacciones de amplificación se realizaron tal como se indica en el apartado 3.3.5.2 (Eficiencia de los cebadores).

En la tabla 22 se muestran los valores C_T obtenidos para cada pareja de cebadores. A partir de estos valores, se calculan las rectas de regresión (Figura 27) para obtener el valor de m y calcular la eficiencia (Tabla 23).

Tabla 22.- Valores de C_T obtenidos en las amplificaciones mediante PCR- Cuantitativa, con los cebadores diseñados para los genes seleccionados. Se utilizó diluciones de cDNA de 1, 1:2, 1:4 y 1:6 de anteras a los 16 días de cultivo (16dc) de la línea DH6183 para el gen *Hv-ALB5*. Se hicieron las mismas diluciones de anteras a los 8 días de cultivo (8dc) de la línea DH 6148 para el resto de genes.

Gen	Muestra cDNA	Dilución cDNA	C_{Tm}
RHB1A	8dc, DH6148	1:1	31,938
		1:2	33,906
		1:4	34,879
		1:6	35,454
SBE	8dc, DH6148	1:1	35,136
		1:2	34,556
		1:4	36,396
		1:6	36,957
NOS1	8dc, DH6148	1:1	29,274
		1:2	30,941
		1:4	31,973
		1:6	32,383
RLUB	8dc, DH6148	1:1	32,466
		1:2	34,113
		1:4	33,916
		1:6	36,951
DAG	8dc, DH6148	1:1	26,943
		1:2	28,882
		1:4	29,944
		1:6	30,093
TAB	8dc, DH6148	1:1	28,886
		1:2	30,662
		1:4	31,675
		1:6	31,953
Hv-ALB5	16dc, DH6183	1:1	29,786
		1:2	31,182
		1:4	31,951
		1:6	32,412

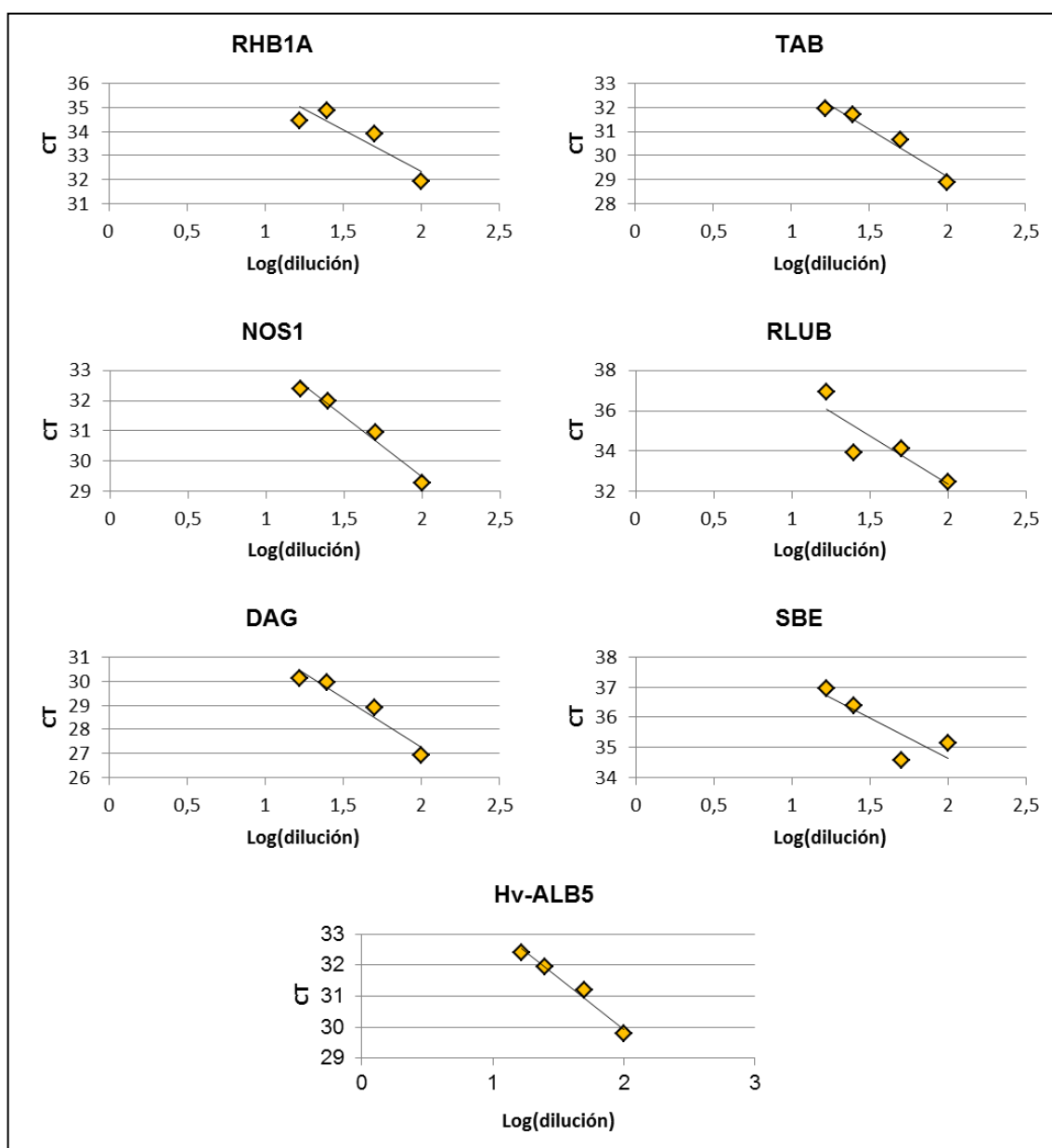


Figura 27.- Rectas de regresión de los pares de cebadores calculadas a partir de los valores de C_T obtenidos en las amplificaciones de las diluciones de cDNA (1, 1:2, 1:4, 1:6).

Se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores con una eficiencia entre el 90 y el 100%. De los genes estudiados únicamente los genes *RHB1A* y *Hv-ALB5* cumplían este requisito y por lo tanto se seleccionaron para continuar con el análisis.

Tabla 23.- Cálculo de las eficiencias de los cebadores, tras hallar la recta de regresión.

Gen	Recta de regresión	Eficiencia
RHB1A	$y = -3,4009x + 39,165$	96,8%
SBE	$y = -2,6949x + 40,017$	135%
NOS1	$y = -3,9816x + 37,431$	78,3%
RLUB	$y = -4,7464x + 41,857$	62,4%
DAG	$y = -4,0861x + 35,419$	75,7%
TAB	$y = -3,9482x + 37,029$	79,2%
Hv-ALB5	$y = -3,3083x + 36,557$	100,5%

- Gen control y ajuste de muestras.

Para evaluar el nivel de expresión de los genes estudiados en cada una de las muestras se empleó el método del C_T comparativo. Los valores C_T obtenidos para cada gen en cada punto se corrigieron respecto a los valores obtenidos para el gen de expresión constitutiva *GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO-DESHIDROGENASA* (GAPDH) y así eliminar la variación experimental (ΔCT).

A partir de una dilución inicial de 1:5 de los cDNA, se realizaron nuevas diluciones hasta aproximar las C_T de las muestras a la escogida como referencia del gen control, $C_T=30$.

4.3.2.- Determinación de los niveles de expresión de los genes *RHB1A* y *Hv-ALB5* en las primeras fases de cultivo de anteras.

Para cuantificar la expresión de los genes a lo largo de la fase inicial del cultivo de anteras, se utilizaron dos réplicas biológicas de las muestras correspondientes a las anteras a los 0 y 4 días después del tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183. De cada una de las réplicas biológicas se analizaron dos réplicas técnicas.

Se realizaron simultáneamente las amplificaciones del gen analizado y el gen control para cada una de las muestras y replicas. Los valores CT obtenidos para cada gen analizado se corrigieron respecto a los valores obtenidos para gen control GAPDH, utilizando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen 2001) según se especifica en el apartado 3.3.5.2 (Análisis de qRT-PCR) y se determinaron los valores de expresión de los genes (Tabla 24 y 25).

Tabla 24.- Cuantificación de la expresión del gen RHB1A mediante PCR- Cuantitativa utilizando como control el gen GAPDH, en muestras de anteras a los 0 y 4 días después del tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc), de dos replicas biológicas (A y B) y dos replicas técnicas (1 y 2) de las líneas DH6148 y DH6183.

Genotipo	Muestra	C _T gen	C _T media gen	C _T control	C _T media control	ΔC_{Tm}	P _o	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta CT)}$	$2^{(-\Delta\Delta CT)_m}$
DH6148-A1	0dc	34,406	33,929	29,211	29,339	4,591	7,004	-2,414	5,328	3,437
DH6148-A2	0dc	33,452		29,466						
DH6148-B1	0dc	36,046		28,742						
DH6148-B2	0dc	34,765		29,319						
DH6148-A1	4dp	36,517	36,281	27,881	27,826	8,456	7,004	1,452	0,366	0,715
DH6148-A2	4dp	36,045		27,770						
DH6148-B1	4dp	36,156		29,724						
DH6148-B2	4dp	36,933		29,535						
DH6148-A1	4dc	36,984	37,164	28,006	27,948	9,216	7,004	2,212	0,216	0,899
DH6148-A2	4dc	37,343		27,889						
DH6148-B1	4dc	37,429		29,638						
DH6148-B2	4dc	35,156		30,263						
DH6148-A1	8dc	35,962	35,666	28,668	28,662	7,004	7,004	0,000	1,000	1,789
DH6148-A2	8dc	35,369		28,656						
DH6148-B1	8dc	33,966		28,269						
DH6148-B2	8dc	33,706		28,127						
DH6148-A1	12dc	35,769	36,641	28,187	28,231	8,410	7,004	1,406	0,377	0,377
DH6148-A2	12dc	37,513		28,275						
DH6148-B1	12dc	36,076		27,851						
DH6148-B2	12dc	---		27,884						
DH6148-A1	16dc	35,726	35,627	28,068	28,119	7,508	7,004	0,504	0,705	1,388
DH6148-A2	16dc	35,528		28,169						
DH6148-B1	16dc	34,769		29,069						
DH6148-B2	16dc	35,576		29,368						
DH6183-A1	0dc	32,152	32,365	28,805	28,866	3,500	7,004	-3,504	11,349	10,236
DH6183-A2	0dc	32,578		28,926						
DH6183-B1	0dc	32,206		28,384						
DH6183-B2	0dc	32,300		28,493						
DH6183-A1	4dp	---	---	27,732	27,780	---	7,004	---	---	0,545
DH6183-A2	4dp	---		27,828						
DH6183-B1	4dp	36,312		28,461						
DH6183-B2	4dp	36,573		28,665						
DH6183-A1	4dc	36,084	35,027	27,924	28,130	6,897	7,004	-0,108	1,077	0,702
DH6183-A2	4dc	33,969		28,336						
DH6183-B1	4dc	36,282		28,540						
DH6183-B2	4dc	37,857		28,371						
DH6183-A1	8dc	35,774	36,008	28,600	28,720	7,289	7,004	0,284	0,821	0,821
DH6183-A2	8dc	36,242		28,839						
DH6183-B1	8dc	---		28,734						
DH6183-B2	8dc	---		28,546						
DH6183-A1	12dc	35,452	36,118	30,898	29,668	6,450	7,004	-0,554	1,469	1,363
DH6183-A2	12dc	36,783		28,438						
DH6183-B1	12dc	35,714		28,672						
DH6183-B2	12dc	35,471		29,164						
DH6183-A1	16dc	36,790	37,144	30,930	29,632	7,512	7,004	0,508	0,703	0,703
DH6183-A2	16dc	37,497		28,334						

Tabla 25.- Cuantificación de la expresión del gen *Hv-ALB5* mediante PCR- Cuantitativa utilizando como control el gen *GAPDH*, en muestras de anteras a los 0 y 4 días después del tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de dos replicas biológicas (A y B) y dos replicas técnicas (1 y 2) de las líneas DH6148 y DH6183.

Genotipo	Muestra	C _T gen	C _T media gen	C _T control	C _T media control	ΔC_{Tm}	P _o	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta CT)}$	$2^{(-\Delta\Delta CT)_m}$
DH6148-A1	0dc	31,295	31,588	31,225	31,296	0,293	1,820	-1,528	2,883	1,808
DH6148-A2	0dc	31,881		31,366						
DH6148-B1	0dc	33,438		31,231						
DH6148-B2	0dc	33,550		31,223						
DH6148-A1	4dp	31,672	31,812	29,575	29,600	2,213	1,820	0,393	0,762	1,442
DH6148-A2	4dp	31,952		29,624						
DH6148-B1	4dp	31,914		30,962						
DH6148-B2	4dp	31,926		31,408						
DH6148-A1	4dc	32,824	33,221	29,846	29,869	3,352	1,820	1,532	0,346	4,913
DH6148-A2	4dc	33,618		29,892						
DH6148-B1	4dc	31,275		33,232						
DH6148-B2	4dc	31,126		32,019						
DH6148-A1	8dc	32,571	32,639	30,816	30,819	1,820	1,820	0,000	1,000	2,533
DH6148-A2	8dc	32,707		30,822						
DH6148-B1	8dc	32,418		30,262						
DH6148-B2	8dc	32,373		34,936						
DH6148-A1	12dc	32,605	32,781	30,580	30,506	2,275	1,820	0,455	0,730	0,559
DH6148-A2	12dc	32,957		30,432						
DH6148-B1	12dc	33,590		30,322						
DH6148-B2	12dc	33,394		30,288						
DH6148-A1	16dc	32,614	32,803	30,017	30,235	2,568	1,820	0,748	0,595	0,873
DH6148-A2	16dc	32,991		30,452						
DH6148-B1	16dc	32,860		30,877						
DH6148-B2	16dc	32,330		31,076						
DH6183-A1	0dc	31,819	31,923	30,514	30,464	1,460	1,820	-0,360	1,284	1,993
DH6183-A2	0dc	32,027		30,413						
DH6183-B1	0dc	30,858		30,660						
DH6183-B2	0dc	30,947		30,373						
DH6183-A1	4dp	31,221	31,228	30,001	31,238	-0,010	1,820	-1,830	3,555	2,728
DH6183-A2	4dp	31,235		32,475						
DH6183-B1	4dp	31,705		30,800						
DH6183-B2	4dp	31,536		30,654						
DH6183-A1	4dc	32,152	32,106	30,286	30,364	1,742	1,820	-0,078	1,056	0,895
DH6183-A2	4dc	32,059		30,441						
DH6183-B1	4dc	33,020		30,646						
DH6183-B2	4dc	32,636		30,481						
DH6183-A1	8dc	32,555	33,129	30,559	30,755	2,374	1,820	0,554	0,681	0,702
DH6183-A2	8dc	33,702		30,951						
DH6183-B1	8dc	34,785		30,356						
DH6183-B2	8dc	30,898		30,747						
DH6183-A1	12dc	31,227	31,206	30,955	30,779	0,427	1,820	-1,393	2,625	1,796
DH6183-A2	12dc	31,185		30,602						
DH6183-B1	12dc	32,515		30,835						
DH6183-B2	12dc	33,294		31,237						
DH6183-A1	16dc	31,649	31,540	30,229	30,333	1,207	1,820	-0,613	1,529	1,529
DH6183-A2	16dc	31,430		30,436						

La representación gráfica de los valores de expresión obtenidos (Figura 28 y 29), nos mostró que existía una gran variabilidad entre replicas biológicas, en especial en la línea DH6148. Sin embargo, se apreciaban diferencias en el perfil de expresión de los genes entre las líneas.

El gen *RHB1A* se expresaba en las dos líneas a un nivel más alto en las anteras antes de iniciar el proceso, siendo mayor en DH6183 la línea más albina. Posteriormente, la expresión decaía después del tratamiento de estrés aumentado ligeramente hasta los 8dc en la línea DH6148 y a los 12dc en la línea DH6183.

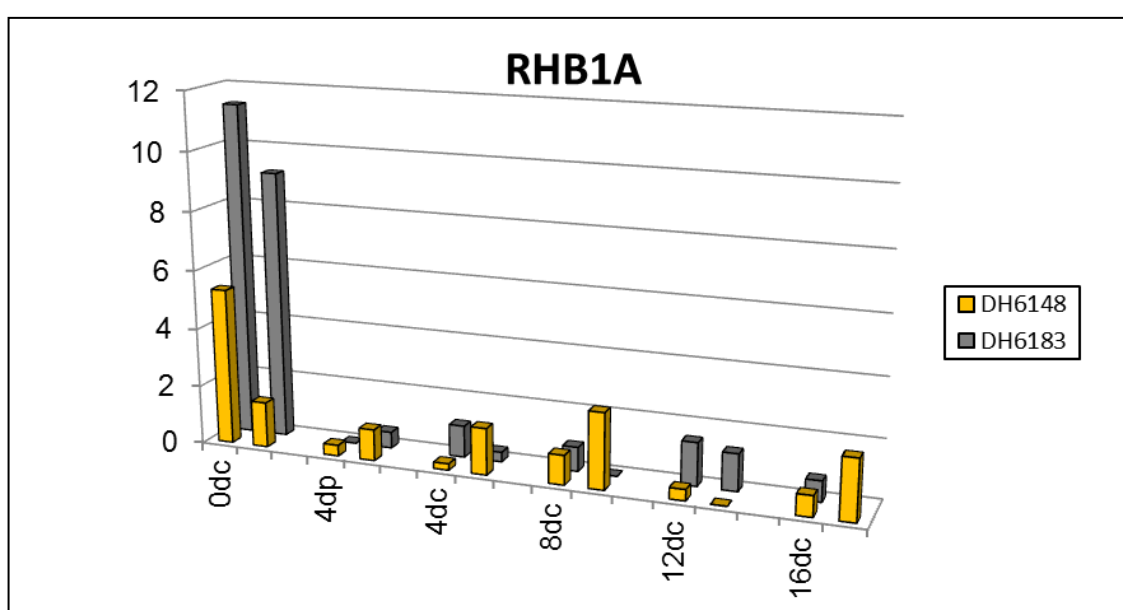


Figura 28.- Representación gráfica de los valores de expresión del gen *RHB1A* obtenidos mediante PCR-Cuantitativa, utilizando como control el gen *GAPDH*. Las muestras correspondían a anteras a los 0 y 4 días de tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de dos replicas biológicas de las líneas DH6148 y DH6183.

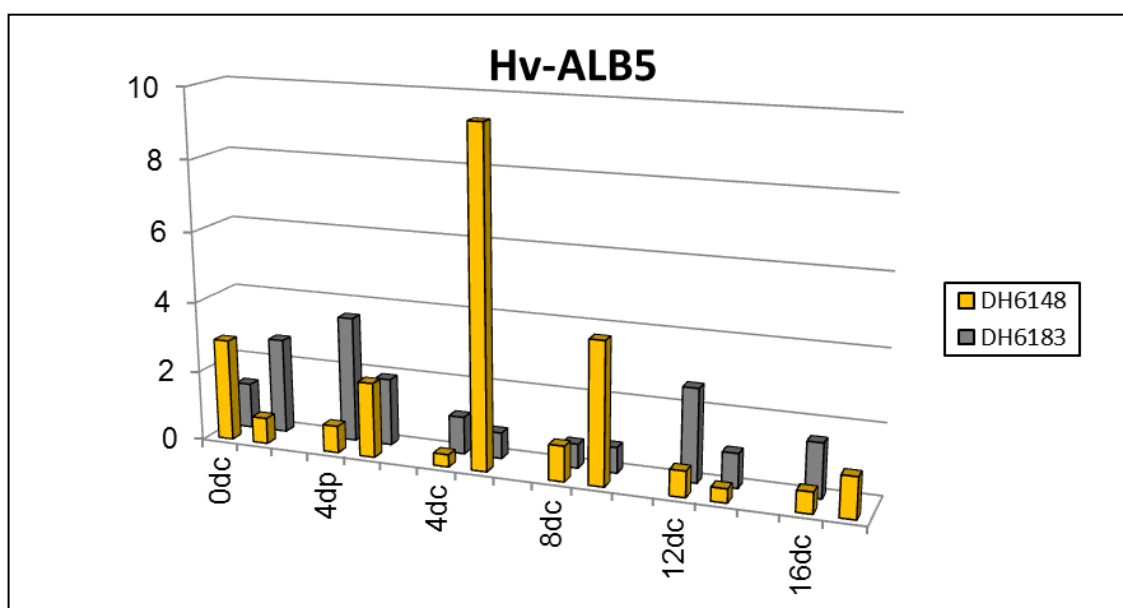


Figura 29.- Representación gráfica de los valores de expresión del gen *Hv-ALB5* obtenidos mediante PCR- Cuantitativa utilizando como control el gen *GAPDH*. Las muestras correspondían a anteras a los 0 y 4 días de tratamiento de estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de dos replicas biológicas de las líneas DH6148 y DH6183.

En el análisis de expresión del gen *Hv-ALB5*, las diferencias entre las réplicas biológicas de la línea DH6148 fueron muy grandes, haciendo difícil interpretar los resultados. En la línea DH6183 parecía existir una activación del gen durante el tratamiento de estrés y de nuevo a los 12-16 días de cultivo.

5.- DISCUSIÓN

Para satisfacer la cada vez mayor demanda de cereales, los programas de mejora disponen de herramientas biotecnológicas que permiten la creación, análisis y manipulación de la variabilidad genética, y entre éstas, la producción de doblehaploides (DHs). La introducción de las plantas DHs en programas de mejora, tiene como ventaja fundamental el permitir acortar el tiempo necesario para la obtención de nuevas variedades (Snape y col. 1986, Thomas y col. 2003), al alcanzar la homocigosis en una sola generación (Kasha 2005). Así, mientras que con los métodos tradicionales de mejora para la obtención de nuevas variedades se necesitan de 10 a 12 años con sucesivas generaciones de autofecundación hasta conseguir la homocigosis, utilizando plantas DHs estos métodos se acortan en unos 4 a 6 años.

En la actualidad, el método embriogénesis de la microspora, mediante el cultivo de anteras o microsporas aisladas, es la técnica de producción de DHs con mayor potencialidad. Aunque la cebada se considera una especie modelo en la embriogénesis de la microspora, algunos cultivares de gran importancia agronómica presentan tasas de embriogénesis bajas y altos porcentajes de albinismo (Muñoz-Amatriaín y col. 2008).

Se ha descrito que, en algunos casos, las plantas albinas regeneradas mediante cultivo de anteras o microsporas presentan alteraciones en el tamaño y la organización interna de los plástidos (Careda y col. 1999, 2000), deficiencias en los ribosomas plastídicos y la presencia de un patrón de transcripción y traducción alterado en comparación con las plantas verdes (Hofinger y col. 2000). El porcentaje de albinismo en las plantas regeneradas presenta una fuerte dependencia del genotipo, pero también existen factores fisiológicos que pueden aumentar este porcentaje como: el estado de desarrollo de la microspora (He y Ouyang 1984), el pretratamiento de estrés (Touraev y col. 1996a, Kunz y col. 2000), el medio de cultivo (Liang y Hassawi 1990) y la duración del cultivo (Cistué y col. 1995, Puolimatka y Pauk 2000).

Muchos estudios que se han centrado en determinar el origen y las causas del albinismo, lo han hecho a través del análisis de las plantas albinas regeneradas (para revisión ver en Makowska y Oleszczuk 2013). Sin embargo, no se tiene información de en que momento durante el cultivo de anteras o microsporas se producen las modificaciones observadas; si ya existían en las anteras antes de iniciar el proceso, si

se producen por el tratamiento de estrés, o a lo largo del proceso de embriogénesis, o durante la regeneración de plantas o de forma distinta en cada una de las fases.

El objetivo final de este trabajo fue determinar los mecanismos moleculares que pueden estar asociados al albinismo en las fases iniciales de la embriogénesis de la microspora en cebada, a través del análisis de la expresión de genes asociados funcionalmente con los plástidos.

Los materiales utilizados correspondían a líneas de una población especialmente diseñada para el estudio genético del albinismo en cebada, y a variedades de cebada con porcentajes de regeneración de plantas albinas muy distintos.

Para este estudio se seleccionaron tres colecciones de genes que permitían abarcar distintos aspectos del albinismo en cultivo de anteras en cebada: 30 genes que se inducen en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora (EM), 17 genes mapados en regiones cromosómicas donde se habían localizado QTLs asociados al albinismo en cultivo de anteras (QTL-Alb) (Muñoz-Amatriain y col. 2008) y 20 genes que mostraban diferencias de expresión en distintos mutantes albinos de cebada (M-Alb) (Svensson y col. 2006). Para todos los genes se establecieron las mejores homologías entre las secuencias de los genes y los genes registrados en las bases de datos generales de secuencias y en las específicas de arroz y de *Arabidopsis*, y así poder asociar una función a cada uno de los genes.

Como las fases iniciales de la embriogénesis de la microspora se realizan en condiciones de oscuridad y en materiales no fotosintéticos, el primer análisis se realizó en hojas verdes y albinas de plantas regeneradas por cultivo de anteras. Esta estrategia nos permitiría seleccionar los genes que presentan una expresión alterada en los materiales albinos respecto a los verdes. Las hojas se tomaron de tres variedades de cebada (Vanessa, Siberia y Static) que en cultivo de anteras presentaban porcentajes de albinismo muy altos, superiores al 90% (Apartado 3.1.1, tabla 4) (Muñoz-Amatriain y col. 2008).

En la comparación de la expresión génica de los 67 genes entre hojas verdes y albinas de las tres variedades (Anexo II), se observó que la mayoría de los genes presentaban diferencias de expresión al menos en alguna de las variedades. Por lo

tanto, se pudo demostrar que las hojas albinas, efectivamente, presentaban grandes alteraciones en la expresión de los genes relacionados con los plástidos. Sin embargo, estas alteraciones en muchos casos no eran consistentes en las tres variedades. Hay que tener en cuenta que aunque las tres variedades presentaban niveles de albinismo muy altos, diferían en otros caracteres asociados al cultivo de anteras y en particular en el porcentaje de regeneración de plantas como se muestra en la Figura 30. Por lo tanto, la calidad de las hojas albinas regeneradas podía diferir entre las variedades y las diferencias en los patrones de expresión podrían deberse en algunos casos al grado de desarrollo de la hoja de la plántula albina. Por ello, 52 genes se excluyeron de posteriores análisis al presentar una inconsistencia en las diferencias de expresión entre hoja albina y hoja verde entre las tres variedades.

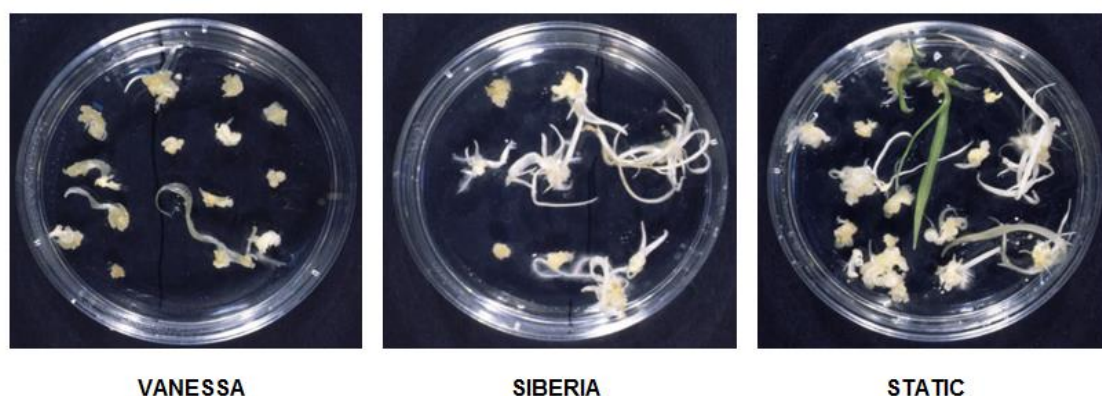


Figura 30.- Regeneración de plántulas albinas y verdes en cultivo de anteras de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static.

De los 12 genes candidatos seleccionados, 6 de ellos (*RHB1A*, *SBE*, *SIG*, *NOS1*, *RRF* y *RLUB*) pertenecían a la colección EM de genes inducidos en las primeras fases del cultivo de anteras; uno (*Hv-ALB5*) a la colección de QTL-Alb asociados a QTLs de albinismo y 5 (*WCAB-2*, *WCAB-1*, *PSAN*, *RNS* y *JRL*) a la colección M-Alb asociada a mutantes albinos de cebada. Se incluyeron en el análisis otros tres genes (*DAG*, *TAB* y *RLP28*) que presentaban diferencias de expresión entre hojas albinas y verdes en al menos una variedad, pero con patrones de expresión inconsistentes y en algunos casos hasta opuestos entre las variedades, permitiendo diferenciar el comportamiento de las variedades respecto al albinismo en hoja regenerada.

Al agrupar los genes seleccionados por categorías funcionales, distinguimos: los genes asociados a los mecanismos fotosintéticos *WCAB-2*, *WCAB-1*, *PSAN*, *RHB1A* y *SBE*; los asociados a la respuesta al estrés *RNS* y *JRL* y finalmente los asociados a la regulación de la expresión génica *SIG*, *NOS1*, *RRF*, *RLUB*, *DAG*, *TAB* y *RLP28*. Sólo en un gen de los seleccionados no se halló homología con ninguna secuencia conocida y por ello se le asignó el acrónimo *Hv-ALB5* (*Hordeum vulgare*-Albinismo).

Para determinar los mecanismos moleculares asociados al albinismo en las fases iniciales de la embriogénesis de la microspora, no solo necesitamos genes candidatos que permitan diferenciar materiales verdes y albinos, sino líneas y/o variedades entre las que las diferencias en la respuesta al cultivo de anteras sean mínimas, excepto para el porcentaje de albinismo. Por ello, se estudiaron los perfiles de expresión de los 15 genes seleccionados en dos líneas DHs, DH6148 y DH6183, que presentaban porcentajes de albinismo de 4,17 y 87,49%, respectivamente (Apartado 3.1.1, tabla 3). Estas líneas pertenecen a una población de líneas casi isogénicas diseñada específicamente para el estudio del albinismo en cultivo de anteras de cebada. En esta población se había minimizado la variabilidad en distintos caracteres de la respuesta al cultivo de anteras y maximizado las diferencias debidas al albinismo (Muñoz- Amatriaín y col. 2008).

Para validar los patrones de expresión de los genes asociados al albinismo obtenidos en las dos líneas DHs específicas, estos se estudiaron en tres variedades con distinto porcentaje de albinismo, pero que se diferenciaban también en otros aspectos de la respuesta al cultivo: Orelie (2,87% de albinismo), Volley (0% de albinismo) y Riviera (92,59% de albinismo) (Apartado 3.1.1, tabla 4). La comparación de los patrones de expresión entre las variedades Orelie y Volley con porcentajes de albinismo bajos, nos permite distinguir también los genes ligados al albinismo pero asociados a baja respuesta al cultivo de anteras, ya que Volley es una variedad con muy baja respuesta (31,82 plantas verdes por 100 anteras sembradas) mientras que Orelie es de buena respuesta (220,92 plantas verdes por 100 anteras sembradas).

Los resultados obtenidos al estudiar los genes relacionados con la fotosíntesis, nos mostraron distinto comportamiento entre los genes asociados a la fase luminosa y los asociados a la fase oscura de la fotosíntesis. Los genes relacionados con la fase luminosa *WCAB-1* y *WCAB-2* (*CHLOROPHYLL a-b BINDING PROTEÍN*) que codifican

para proteínas de unión entre las moléculas de pigmentos clorofila a y b de los complejos captadores de luz (Klimmek y col. 2006, Aghdasi y col. 2012) y el gen *PSAN* (*PHOTOSYSTEM I REACTION CENTER SUBUNIT N*) que codifica para una proteína del centro de reacción del fotosistema I (Haldrup y col. 1999, Amunts y col. 2010), no se expresaban durante las primeras fases del cultivo de anteras. Esta falta de expresión no se puede asociar directamente a fenómenos de albinismo como se hacía en las hojas albinas, ya que también podría corresponder a su dependencia a la luz, ya que la fase inicial del cultivo de anteras se realiza en la oscuridad.

Entre los genes asociados a la fase oscura de la fotosíntesis, el gen *RHB1A* (*RING-H2 finger B1A*) que codifica para una proteína con un dominio de tipo “Zinc finger, C3H2C3” denominado “RING-H2”, y que parece estar implicada en la formación de complejos multiproteicos asociados a la fase oscura de la fotosíntesis (Jensen y col. 1998, Ma y col. 2009) y en procesos de control de fotoperiodo (TAIR), se expresaba en las fases iniciales de cultivo de anteras tanto en las líneas como en las variedades estudiadas (Figura 31). Aunque se observaron diferencias en el perfil de expresión en los dos materiales estudiados, estas diferencias no se pudieron asociar al albinismo “per se”, ya que las variedades Volley (0% plantas albinas) y Riviera (92,59% plantas albinas) presentaban un perfil de expresión similar (Figura 31).

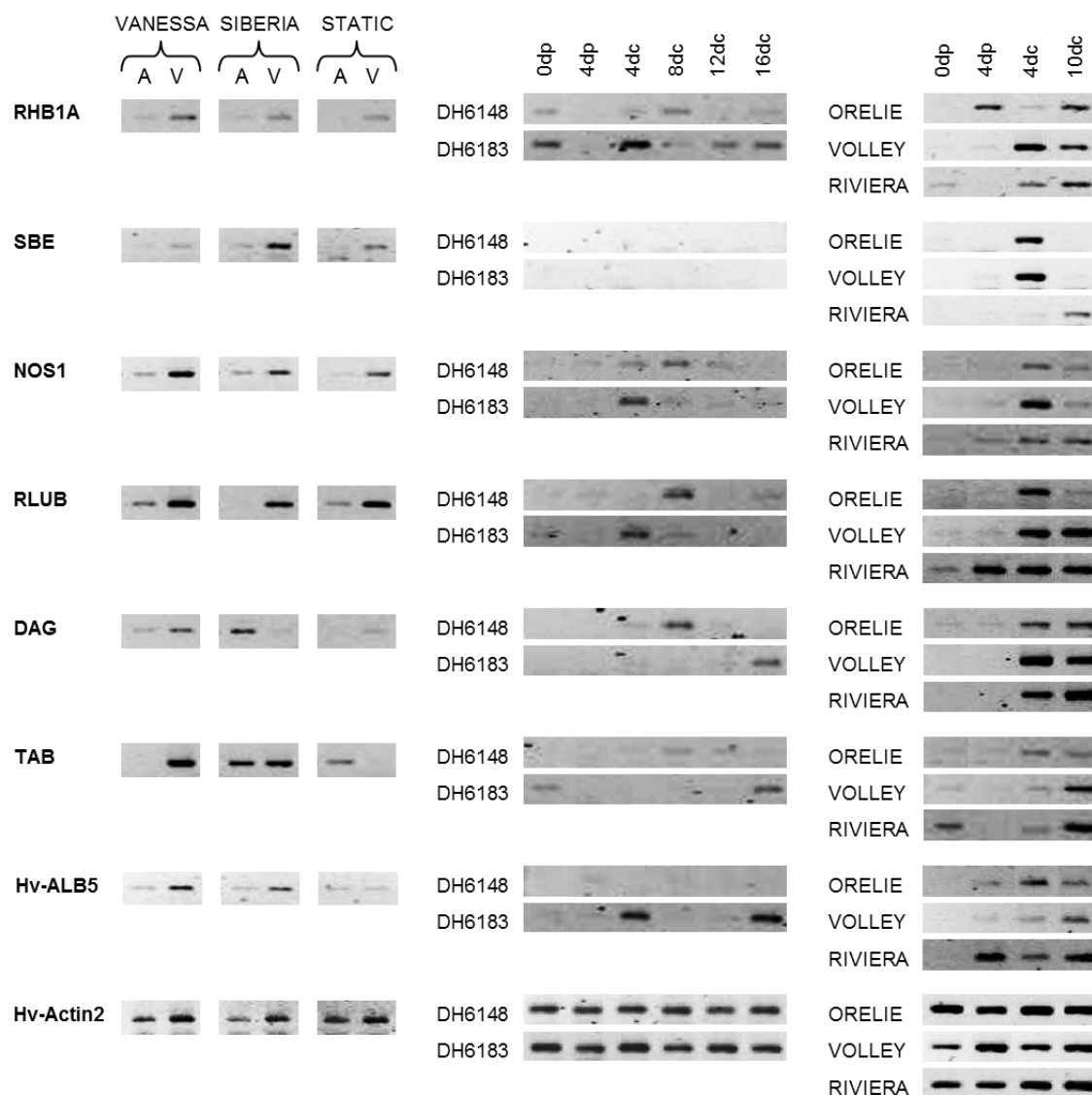


Figura 31.- Comparación de los perfiles de expresión de los 7 genes que presentaban diferencias de expresión entre materiales que generan altos y bajos porcentajes de albinismo en cultivo de anteras. Se incluyen los resultados de: muestras de hojas albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades Vanessa, Siberia y Static; anteras a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183 y anteras a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4 y 10 días de cultivo de anteras (4dc y 10dc) de las variedades Orelie, Volley y Riviera. Gen constitutivo Hv-Actin2.

El gen *SBE* (*STARCH BRANCHING ENZYME*) que codifica para una enzima de ramificación del almidón (McCue y col. 2002) y que estaba asociado a la fase oscura de la fotosíntesis, también se expresa en las primeras fases de cultivo de anteras pero solo en las variedades (Figura 31). El perfil de expresión en las variedades mostraba una inducción más tardía en la variedad albina, por lo tanto

podría indicar que el momento de la inducción del gen estaría asociado al albinismo. La asociación del albinismo y los niveles de almidón en cultivo de anteras se ha propuesto en distintos trabajos. En los estudios llevados a cabo por Caredda y colaboradores (1999, 2000 y 2004) se observó que mientras la variedad “verde” Igri, acumulaba más almidón en los primeros días de cultivo, la variedad “albina” Cork, lo hacía en los últimos días del cultivo, lo que se correspondería con las diferencias en los perfiles de expresión entre variedades en el gen *SBE* observadas en este trabajo. Sin embargo, como la asociación con el albinismo no se observó entre las líneas DHs estudiadas, nuestros resultados parecen confirmar la hipótesis de Wojnarowiec y col. (2004), que el retraso en la síntesis de almidón es un mecanismo que acompaña al albinismo en algunos materiales, pero no es la causa del mismo.

La influencia sobre el porcentaje de albinismo de los distintos tipos de tratamientos de estrés que se han aplicado para conseguir la embriogénesis de la microspora, ha sido ampliamente estudiada (ver revisión en Islam y Tuteja 2012). Para este trabajo se seleccionaron dos genes asociados con la respuesta al estrés que presentaban diferencias de expresión entre las hojas albinas y verdes: el gen *RNS* que codifica para una glicoproteína con actividad de ribonucleasa (RNase S-like protein) (Bariola y col. 1994, 1999, Hillwig y col. 2011) implicada en liberación de P en condiciones de estrés, y el gen *JRL* (*JACALIN-RELATED LECTIN*) que codifica para una lecitina con dominios “Jacalin” que se unen a carbohidratos facilitando la aglutinación celular y la precipitación de glicoconjugados (Kittur y col. 2009, Xiang y col. 2011). Ninguno de los dos genes presentó expresión diferencial entre materiales en el cultivo de anteras indicando que la diferente respuesta al estrés de las plantas albinas se establecía en fases del proceso más avanzadas de las estudiadas en este trabajo.

De los genes candidatos seleccionados, los genes asociados al control de la expresión génica son los que mostraron mayores diferencias entre los perfiles de expresión de los materiales que regeneran plantas verdes y los que regeneran plantas albinas en cultivo de anteras.

En los genes *NOS1* y *RLUB*, que habían mostrado una mayor expresión en las hojas verdes en las tres variedades estudiadas, se observaron diferencias en el perfil de expresión asociadas al albinismo en cultivo de anteras tanto en las líneas como en las variedades (Figura 31). Así, el gen *NOS1* (*NO-ASSOCIATED 1*), que codifica para

una GTPasa plastidial no directamente relacionada con la síntesis de NO y que parece tener funciones relacionadas con la biogénesis de ribosomas y la traducción (Zhang y col. 2006, Gas y col. 2009), presenta un pico de activación en la línea albina DH6183 a los 4dc, mientras que en la línea verde DH6184 este pico se muestra a los 8dc. Este desplazamiento del punto de inducción hacia fases más tempranas del cultivo de anteras en los materiales albinos, se pudo observar también en las variedades pero de forma muy débil. Curiosamente, el gen *RLUB* que codifica para una pseudouridina sintasa, con un papel importante en el procesamiento del rRNA, la traducción y la acumulación de proteínas en cloroplastos (Yu y col. 2008, Liu y col. 2010), también presenta un desplazamiento del punto de máxima expresión entre DH6183 y DH6148 y del mismo signo que el gen *NOS1*. Este desplazamiento también se observa en la variedad más albina Riviera, aunque en este caso también se aprecia una prolongación del periodo de expresión de este gen en esta variedad y en Volley, variedad con bajo porcentaje de albinismo.

La presencia de un patrón de traducción alterado en las plantas albinas en comparación con las plantas verdes derivadas de cultivo de anteras ya se había descrito anteriormente (Hofinger y col. 2000), detectándose niveles de expresión más bajos en los genes *16S* y *23S rRNA*. También defectos en la edición del RNA se habían señalado en las plantas albinas, describiéndose como causantes de muchas incompatibilidades nucleo-citoplasma, aunque se sabía que en cereales la traducción en los plástidos no era necesaria para la viabilidad celular (ver revisión en Kumari y col. 2009)

Dos genes *DAG* y *TAB*, que no habían mostrado un patrón de expresión asociado consistentemente al albinismo en los análisis de hojas, mostraron diferencias en los perfiles de expresión entre líneas en cultivo de anteras (Figura 31). Los dos genes están asociados a procesos de desarrollo de plástidos. El gen *DAG* (*DIFFERENTIATION AND GREENING*) (Chatterjee y col. 1996) se necesita para la expresión de genes nucleares que actúan en el cloroplasto como *CAB* y *RBCS*, o para la de genes de plástidos como la polimerasa *RPOB*, expresándose de forma muy temprana en el desarrollo de los cloroplastos o etioplastos. Por otra parte, el gen *TAB* (*TRANSLATION OF psaB*) está implicado procesos de traducción necesarios para la síntesis de los fotosistemas, afectando también a la biogénesis de membranas de los tilacoides (Stampacchia y col. 1997). Al igual que ocurría en los perfiles de expresión de los genes *NOS1* y *RLUB*, en los genes *DAG* y *TAB* también se aprecia un

desplazamiento en el punto de inducción de los genes entre la línea verde y la línea albina, aunque en este caso de mayor proporción y de signo contrario, ya que en DH6148 se inducen alrededor de 8dc y en la línea albina DH6183 no lo hacen hasta los 16dc.

En estudios que caracterizaban la estructura de los plástidos a lo largo del cultivo de anteras de cebada (Careda y col.1999, 2000 y 2004) se observó que en una variedad que producía plantas verdes, ya al inicio del cultivo se aprecia un aumento en el número de membranas internas, sin embargo, en la variedad albina no se aprecia un aumento hasta los 12dc. Estas observaciones concuerdan con las diferencias en los perfiles de expresión en genes implicados en el desarrollo de plástidos de este estudio. Hay que remarcar que en los análisis realizados en las variedades no se apreciaron diferencias en los perfiles de expresión en ninguno de los genes, por lo que será necesario continuar los estudios en nuevas líneas y variedades para comprobar estas asociaciones.

Finalmente, los resultados obtenidos con el gen de función desconocida *Hv-ALB5* (Figura 31) tampoco eran consistentes entre el análisis de las líneas y de las variedades, mientras en las líneas su función podría estar asociada a la línea albina, en las variedades únicamente se aprecian diferencias en el nivel de expresión siendo ligeramente superior en la variedad albina.

Como en algunos de los genes las diferencias de expresión entre líneas o variedades eran débiles y de carácter cuantitativo, siendo difíciles de interpretar cuando se realizan los análisis de expresión mediante técnica de PCR- Semicuantitva, se ensayó el uso de la técnica PCR- Cuantitativa en muestras de anteras de las líneas DHs. Sin embargo, la disponibilidad de sólo dos replicas biológicas de los materiales y la dificultad para obtener cebadores de alta calidad para los genes de interés, limitó esta aproximación. Así de los 7 genes seleccionados, solo se pudieron analizar dos genes *RHB1A* y *Hv-ALB5*. Este estudio se ha de considerar como una aproximación que nos ha permitido determinar los problemas existentes al aplicar esta técnica a estos materiales y la necesidad de una optimización de las distintas fases del proceso.

Uno de los problemas asociados a las técnicas de embriogénesis de la microspora es la variabilidad existente en la respuesta a cultivo de los distintos lotes de plantas donadoras de anteras. En estudios de Jacquard y col. (2006) ya se

determinó que parámetros fisiológicos internos de las espigas, como los asociados al ciclo anual del cultivo y a la posición de la espiga donadora en la planta, podrían ser algunos de los factores determinantes de la variabilidad observada. Aunque normalmente, debido a la elevada sensibilidad de la PCR- Cuantitativa se deben emplear al menos tres replicas biológicas, se ha propuesto que al estudiar procesos de cultivo *in vitro* serían 5 el número de réplicas biológicas necesarias (Boutilier, K., comunicación personal). Al tratarse de muestras de difícil obtención, el número de muestra que se disponía de partida era reducido y limitaba la obtención de cDNA para el análisis.

Otro de los problemas detectados al trabajar con las secuencias presentes en la base de datos del HarvEST Barley V.1.74 es que en muchos casos estas secuencias son cortas, con lo que el diseño de cebadores óptimos para PCR- Cuantitativa se queda muy limitado. Con la reciente secuenciación del genoma de cebada y el diseño de programas de búsqueda de secuencias asociados al trabajo de secuenciación, este problema podría solventarse (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).

Este trabajo proporciona un punto de partida para el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en la determinación del albinismo en las primeras fases del cultivo de anteras de cebada. Se han podido identificar genes implicados en el control de la expresión génica ligada a procesos de transcripción, biogénesis de ribosomas, procesamiento de rRNA, traducción, que podrían estar implicados en la disfunción de los plástidos, en las estructuras embriogénicas que regeneraran las plantas albinas en cultivo de anteras.

El mayor número de genes con perfiles de expresión alterados en materiales albinos, se dio en la comparación entre líneas DH especialmente diseñadas para el estudio del albinismo. En estas se pudo determinar que tanto los genes *RLUB* y *NOS1* implicados en mecanismos de control de la traducción en plástidos como los genes *DAG* y *TAB* implicados en procesos de desarrollo funcional de los plástidos, presentaban un pico de expresión a los 8dc en la línea DH6148 con un porcentaje de albinismo del 4,17% (Figura 32).

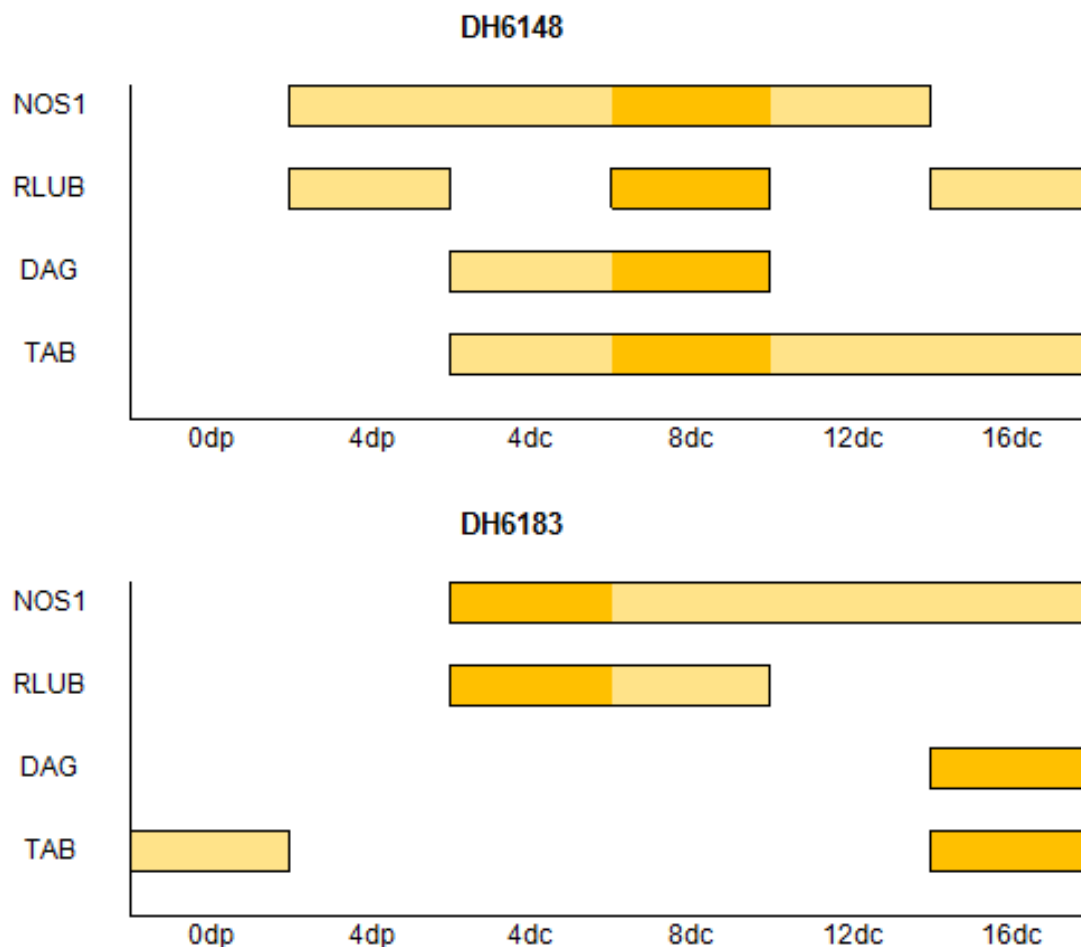


Figura 32.- Representación cronológica de la expresión de los genes *NOS1*, *RLUB*, *DAG* y *TAB*, en cultivo de anteras a los 0 y 4 días de inducción por estrés (0dp y 4dp) y a los 4, 8, 12 y 16 días de cultivo de anteras (4dc, 8dc, 12dc y 16dc) de las líneas DH6148 y DH6183.

Sin embargo, en la línea DH6183 con un porcentaje de albinismo elevado (87,49%) no se aprecia esta coordinación (Figura 32) ya que los genes implicados en el control de la traducción “per se” (*RLUB* y *NOS1*) presentan picos de expresión a los 4dc y los genes *DAG* y *TAB* asociados al control del desarrollo funcional de los plástidos se expresan a los 16dc, cuando las estructuras embriogénicas ya están bien formadas. Estos resultados parecen indicar que al inicio de la embriogénesis de la microspora se puede producir una descoordinación entre los mecanismos básicos de control de la expresión génica y los destinados a alcanzar la funcionalidad de los plástidos, y que esta descoordinación podría ser la causa del albinismo en algunos materiales.

Cabe destacar que algunos de estos genes como *RLUB* y *NOS1* también presentaban diferencias en los perfiles de expresión cuando se analizaban las primeras fases del cultivo de anteras en variedades comerciales de cebada con distinto porcentaje de albinismo. Aunque para realizar una comparación más correcta sería necesario realizar el análisis en las mismas fases en todos los materiales.

Por primera vez se han determinado mecanismos moleculares que podrían estar asociados al albinismo en las fases iniciales de la embriogénesis de la microspora en cebada. Las dificultades tanto del abordaje del trabajo en distintos materiales con las dificultades técnicas de puesta a punto de las condiciones de la PCR- Cuantitativa, demuestra la complejidad del estudio. Todavía existen muchas incógnitas para comprender la determinación del albinismo en las fases de cultivo estudiadas. La continuidad de este tipo de estudios se hace necesaria para conseguir el objetivo final de a través de, una modificación de las condiciones de cultivo, se elimine el fenómeno de albinismo y se amplie la producción de líneas DH en la mejora vegetal.

6.- CONCLUSIONES

1. La comparación de la expresión génica de los genes asociados funcionalmente con los plástidos entre hojas verdes y albinas de plantas obtenidas por cultivo de anteras de cebada, demostró que las hojas albinas presentaban grandes alteraciones en la expresión de genes.
2. De los 67 genes analizados, se seleccionaron 12 genes por su consistencia en el perfil de expresión entre las hojas verdes y albinas de las variedades Vanessa, Siberia y Static, y 3 genes que permitían diferenciar entre estas variedades.
3. Se caracterizaron los perfiles de expresión de los genes seleccionados en las primeras fases del cultivo de anteras en dos líneas DHs de una población especialmente diseñada para el estudio genético del albinismo en cebada, y en tres variedades con distinto porcentaje de regeneración de plantas albinas: Orelie, Volley y Riviera.
4. Se observó que los genes relacionados con la fase luminosa de la fotosíntesis (*WCAB-1*, *WCAB-2* y *PSAN*,) no se expresaban, no pudiendo determinar si se debía a alteraciones asociadas al proceso o a su dependencia de la luz.
5. Entre los genes asociados a la fase oscura de la fotosíntesis (*RHB1A* y *SBE*), destacó el gen *SBE* que codifica para una enzima de ramificación del almidón. Este gen presentaba una inducción más tardía en la variedad albina Riviera y coincide con los resultados de los niveles de almidón en cultivo de anteras obtenidos por otros autores.
6. El estudio de los genes asociados al estrés (*RNS* y *JRL*) indicó que la diferente respuesta al estrés de las plantas albinas se establecía en fases del cultivo de anteras más avanzadas de las estudiadas en este trabajo.
7. Los genes *NOS1* y *RLUB* que intervienen en el control de la expresión génica asociados a procesos de edición de RNA y traducción, mostraban perfiles de expresión diferentes entre materiales verdes y albinos. Estos resultados, concuerdan con los descritos por otros autores, con presencia de defectos en la edición del RNA traducción en plantas albinas.

8. Los genes *DAG* y *TAB*, relacionados a procesos de desarrollo de los plástidos, se inducen más tarde en la línea albina DH6183. Esto coincide con estudios realizados por otros autores, que describían el desarrollo tardío de los plástidos en plantas albinas.
9. Al comparar los perfiles de expresión de los genes *NOS1*, *RLUB*, *DAG* y *TAB* en las primeras fases de cultivo de anteras, se aprecia que en los materiales albinos al inicio de la embriogénesis de la microspora se produce una descoordinación entre los mecanismos básicos de control de la expresión génica y los destinados a alcanzar la funcionalidad de los plástidos. Esta descoordinación podría ser causa del albinismo.
10. Para poder confirmar los resultados obtenidos mediante PCR- Cuantitativa es necesario optimizar la técnica tanto en el número de réplicas biológicas (más de tres réplicas) como en el origen de las secuencias de cebada para un diseño óptimo de cebadores para PCR- Cuantitativa.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Aghdasi, M., Fatahi, S. y Sadeghipour, H. R. (2012). Identification and Characterization of *LHCB1* Co- Suppressed Line in *Arabidopsis*. Biological Sciences, Vol. 2, No. 1: 40-49.

Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A. y Nelson, N. (2010). Structure Determination and Improved. Model of Plant Photosystem I. The Journal of Biological Chemistry, 285: 3478-3486.

Andersen, S.B., Due, I.K. y Olesen, A. (1987). The response of anther culture in genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding 99: 181-186.

Applied Biosystems User Bulletin n°2 (1997). Disponible en: <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04303859.pdf>

Applied Biosystems (2007). Primer Express ® Software v2.0: Designing Primers and TaqMan® TAMRATM probes for 5' nuclease assays and primers for real-time PCR assays using SYBR® Green Dye. Disponible en: http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/taqman/taqman_probes_121502.Cfm

Barinova, I., Cle´ment, C., Martiny, L., Baillieul, F., Soukupova, H., Heberle-Bors, E. y Touraev, A. (2004). The regulation of develop-mental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. Planta 219:141–156.

Bariola, A.P., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D. y Green, P.J. (1994). The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. The Plant Journal 6: 673-685.

Bariola, A.P., MacIntosh, G.C. y Green, P.J. (1999). Regulation of S-Like Ribonuclease Levels in *Arabidopsis*. Antisense Inhibition of *RNS1* or *RNS2* Elevates Anthocyanin Accumulation. Plant Physiology, Vol. 119:331–342.

Bjørnstad, A., Opsahl-Ferstad, H-G. y Aasmo, M. (1989) Effects of donor plant environment and light during incubation on anther cultures of some spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture 17: 27–37.

Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S. y Clément, C. (1999). Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. Protoplasma 208: 248-256.

Caredda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R.S. y Clément, C. (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Sex Plant Reprod 13: 95-104.

Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., Proult, I. y Clément, C. (2004). Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 35-43.

Castillo, A.M., Vallés, M.P. y Cistué, L. (2000). Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113:1-8.

Chatterjee, M., Sparvoli, S., Edmunds, C., Garosi, P., Findlay, K. y Martin, C. (1996). *DAG*, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* 15: 4194–4207.

Chen, X-M., Cistué, L., Muñoz-Amatriaín, M., Sanz, M., Romagosa, I., Castillo, A.M. y Vallés, M.P. (2007). Genetic markers for doubled haploid response in barley. *Euphytica*, 158: 287-294.

Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M. y Romagosa, I. (1994). Production of large number of double haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports* 13:709-712.

Cistué, L., Ziauddin, E., Simion, E. y Kasha, K.J. (1995). Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42:163-169.

Cistué, L., Ramos, A. y Castillo, A.M. (1999). Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids model and low responding cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:159-166.

Cistué, L., Vallés, M.P., Echávarri, B., Sanz, J.M. y Castillo, A.M. (2003). Barley anther culture. En: *Doubled Haploid. Production in Crop Plants*. Malupszynski M, Kasha K, Foster B (eds). FAO/IAEA Division, Wien, A Manual, pp 29-35.

Claveria, E., Garcia- Mas, J. y Dolcet- Sanjuan, R. (2005). Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 555- 560.

Day, A. y Ellis, T.H.N. (1984). Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell* 39: 359-368.

Day, A. y Ellis, T.H.N. (1985). Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Current Genetics* 9: 671-678.

Devaux, P. y Pickering, R. (2005). Haploids in crop improvement of Poaceae. En Haploids in Crop Improvement II, Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K.J. (eds.). Springer- Verlag, Berlin, pp. 215-242.

Dorak M.T. (2008) Glossary of real-time PCR terms. Disponible en: <http://www.dorak.info/genetics/glosrt.html>

Dunford, R. y Walden, R.M. (1991). Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr Genet* 20: 339-347.

Ekiz, H. y Konzak, C. (1997). Effects of light regimes on anther culture response in bread wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50:7-12.

Fadel, F. y Wenzel, G. (1990). Medium-genotype interaction on androgenetic haploid production in wheat. *Plant Breeding* 105:278-282.

FAOSTATS, (2012). Statistics Division. Food and Agriculture Statics global. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>.

Finie, S.J., Powell, W. y Dyer, A.F. (1989). The effect of carbohydrate- composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum- vulgare* L.). *Plant breeding* 10: 110-118.

Forster, B.P. y Powell, W. (1997). Haploidy in barley. En *In vitro* haploid production in higher plants, Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds). Kluwe, Dordrecht, pp. 99-115.

Forster, B.P. y Thomas, W.T.B. (2003). Doubled haploids in genetic mapping and genomics. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual*. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds). Kluwer, Dordrecht, pp. 367-390.

Forster, B.P. y Thomas W.T.B. (2005). Doubled haploids in genetics plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 25: 57-88.

Forster, B.P., Heberle- Bors, E., Kasha, k.J. y Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *TRENDS in Plant Science*, Vol.12 No.8: 368- 375.

Gas, E., Flores, U., Sauret, S. y Rodríguez, M. (2009). Hunting for Plant Nitric Oxide Synthase Provides New Evidence of a Central Role for Plastids in Nitric Oxide Metabolism. *The Plant Cell*, 21:18–23.

González, J.M., Muñiz, L.M. y Jouve, N. (2005). Mapping of QTLs for androgenetic response based on a molecular genetic map of *x Triticosecale* Wittmack. *Genome* 48: 999-1009.

Grosse, B.A., Deimling, S. y Geiger, H.H. (1996). Mapping of genes for anther culture ability in rye by molecular markers. *Vortr Pflanzenzüchtg* 35: 282-283.

Guha, S. y Maheshwari, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 20, pp. 497.

Guha, S. y Maheshwari, S.C. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 212: 97-98.

Guiderdoni, E., Galinato, E., Luistro, J. y Vergara, G. (1992). Anther culture of tropical Japonica \times Indica hybrids of rice (*Oryza-Sativa* L). *Euphytica* 62: 219–224.

Gully, C. (1996). Mutationen im Chloroplastengenom als Auslöser “für” den Albinismus in Pollenpflanzen von Weizen? Diploma thesis, University of Vienna, Vienna. Cited in Ankele et al., 2008.

Haldrup, A., Naver, H. y Scheller, H. V. (1999). The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI- N subunit of photosystem I. *The plant Journal*, 17: 689-698.

Harada, T., Sato, T., Asaka, D. y Matsukawa, I. (1991). Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theor. Appl. Genet* 81: 157-161.

Harada, T., Ishikawa, R., Niizeki, M., y Saito, K. (1992). Pollen-derived rice calli that have large deletions in plastid DNA do not require protein synthesis in plastid for growth. *Mol. Gen. Genet.* 233: 145–150.

He, D.-G. y Ouyang, J.-W. (1984). Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. *Plant Science Letters* 33:71-79.

Hernández, A., Martín, P., Torres, A. y Salido, E. (1994). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *NEFROLOGIA XIV*, 2: 145-162.

Hillwig, M.S., Contento, A.L., Meyer, A., Ebany, D., Bassham, D.C. y MacIntosh, G.C. (2011). *RNS2*, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *PNAS* 108, 3: 1093–1098.

Hoekstra, S., van Ziderveld, M.H., Louwerse, J.D., Heidekamp, F. y van der Mark F. (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science* 86: 89-96.

Hoekstra, S., van Ziderveld, M.H., Heidekamp, F. y van der Mark F. (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolarity. *Plant Cell Reports* 12: 661-665.

Hofinger, B. (1999). Molecular genetic analysis of plastid deficiencies in anther culture-derived albino plants of wheat (*Triticum aestivum*). Diploma thesis, University of Vienna, Vienna.

Hofinger, B.J., Ankele, E., Güllý, Ch., Heberle-Bors, E. y Pfosser, M.F. (2000). The involvement of the plastid genome in albino plant regeneration from microspores in wheat. En: *Biotechnological approaches for utilization of gametic cells*, Bohanec, B. (ed). COST 824 final meeting, Bled, Slovenia: 215-228.

Holme I.B., Olesen A., Hansen N.J.P. y Andersen, S.B. (1999.) Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breeding* 118: 111–117.

Huang, B. (1987). Effects of incubation temperature on microspore callus production and plant regeneration in wheat anther cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9: 45-48.

Hunter C.P. (1987). European Patent Application Nr. 0245898 A2: 1-8.

Immonen, S. (1999). Androgenetic green plants from wither rye, *Secale cereale* L., of diverse origin. *Plant Breed* 118: 319–322.

Islam, S.M. y Tuteja, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science* 182: 134–144.

Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A.M., Sangwan, R.S, Devaux, P. y Clément, C. (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant Cell Rep* 25: 375-381.

Jähne, A. y Lörz, H. (1995). Cereal microspore culture. *Plant Sci* 109: 1-12.

Jensen, J.C. (1977). Monoplonid production by chromosome eliminacion. Berlin, pp. 299- 340.

- Jensen, R.B., Jensen, K.L., Jespersen, H.M. y Skriver, K. (1998). Widespread occurrence of a highly conserved RING-H2 zinc finger motif in the model plant *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 436:283-287.
- Kao K.N., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D., Mallard C. (1991) Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. Plant Cell Reports 9:595-601.
- Kasha, K.J., Ziauddin, A. y Cho, U.H. (1990). Haploids in cereal improvement: Anther and microspore culture. En Gene Manipulation in Plant Improvement II, Gustafson JP (ed). Plenum Press, New York, pp. 213-235.
- Kasha, k.J. (2005). Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. En Haploids in Crop Improvement II, Palmer, C.E., Keller, W.A., Kasha, K.J. (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp.123-151.
- Kittur, F.S., Yu, H.Y., Bevan D.R. y Esen, A. (2009). Homolog of the maize β -glucosidase aggregating factor from sorghum is a jacalin-related GalNAc-specific lectin but lacks protein aggregating activity. Glycobiology 19, 3: 277–287.
- Kiviharju, E. y Pehu, E. (1998). The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and A-sterilis. Plant Cell Tiss Org 54: 97–104.
- Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D. y Jansson, S. (2006). Abundantly and Rarely Expressed *Lhc* Protein Genes Exhibit Distinct Regulation Patterns in Plants. Plant Physiology, 140: 793–804.
- Knudsen, S., Due, I.K. y Andersen, S.B. (1989). Components of response in barley anther culture. Plant Breeding 103: 241-246.
- Kumari, M., Clark, H.J., Small, I. y Siddique, K.H.M. (2009). Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture. Critical Reviews in Plant Science, 28:393–409.
- Kumlehn, J. y Lörz, H. (1999). Monitoring sporophytic development of individual microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). En: Anther and pollen: from biology to biotechnology, Clément C, Pacini E, Audran JC (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, Tokyo, pp 183–190.

Kunz C., Islam S.M.S., Berberat J., Peter S.O., Büter B., Stamp P. y Schmid J.E. (2000). Assesment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *Journal of Plant Physiology* 156:190-196.

Larsen, E.T., Tuveesson, I.K.D. y Andersen SB (1991). Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 82: 417-420.

Liang, G.H., Qi, J. y Hassawi, D.S. (1990). A direct-regeneration system for wheat haploid production. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Bajaj, Y.P.S. (ed) Wheat. Springer Verlag 13: 425-434.

Liu, X., Yu, F. y Rodermel. S. (2010). *Arabidopsis* Chloroplast FtsH, var2 and Suppressors of var2 Leaf Variegation: a Review. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 750–761.

Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *METHODS*, 2: 402-408.

Ma, K., Xiao, J., Li, X., Zhang, Q. y Lian, X. (2009). Sequence and expression analysis of the C3HC4-type RING finger gene family in rice. *Gene* 444: 33–45.

MAGRAMA (2011).Análisis provincial de superficie y producción según tipos. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-deestadistica/2012/default.aspx?parte=3&capitulo=13&grupo=1&seccion=3>

MAGRAMA (2012/2013). Secretaria General Técnica del MAGRAMA. Avances de superficies y producciones de cultivos. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/12-ii-h-agricultura_tcm7-286717.pdf

Makowska, k. y Oleszczuk, S. (2013). Albinism in barley androgénesis. *Plant Cell Rep.* DOI: 10.1007/s00299-013-1543-x

Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. y Szarejko, I. (eds) (2003a). En *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer, Dordrecht.

McCUE, K.F., Hurkman, W.J., Tanka, C.K. y Anderson, O.D. (2002). Starch-Branching Enzymes *Sbe1* and *Sbe2* From Wheat (*Triticum aestivum* cv. Cheyenne): Molecular Characterization, Developmental Expression, and Homoeologue Assignment by Differential PCR. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 191a–191m.

- Moieni, A., Lokos-Toth, K. y Sarrafi, A. (1997). Evidence for genetic control and media effect on haploid regeneration in the anther culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding* 116:502-504.
- Mouritzen Bach, P. y Holm, P.B. (1994). Chloroplast genome breakdown in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) occurs primarily during regeneration. *J Plant Physiol* 144:586–593.
- Mujeeb- Kazi, A. y Riera- Lizarazu, O. (1996). Polyploid production in the Triticeae by sexual hybridization. En *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds). Kluwe Acedemic Publishers, Dordrecht, pp.275-296.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J.T., Castillo, A.M., Cistué, L., Close, T.J. y Vallés, M.P. (2006). Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiol Plantarum* 127: 551-560.
- Muñoz-Amatriaín, M. (2007). Control genético y variación transcripcional de la embriogénesis de la microspora en cebada. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Muñoz-Amatriaín M., Castillo A., Chen X., Cistué L. y Vallés M. (2008). Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Molecular Breeding* DOI: 10.1007/s11032-008-9161-y.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J.T., Castillo, A.M., Cistué, L., Close, T.J.y Vallés, M.P. (2009b). Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct Integr Genomics* 9:311–323.
- Olsen, F.L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Reserach Communications* 52:393–404.
- Orshinsky B.R.y Sadasivaiah R.S. (1997). Effect of plant growth conditions, plating density and genotype, on the anther culture response of soft white spring wheat hybrids. *Plant Cell Reports* 16:758-762.
- Ouyang, J.W. (1986). Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. En *Haploids of higher plants in vitro*: Hu H., Yang Y. (eds). Academic Publishers, Beijing, 2: 26-41.

Palmer, C.E. y Keller, W.A. (2005). Overview of Haploidy. En *Haploids in Crop Improvement II*, Palmer, C.E. y Keller, W.A. y Kasha, K.J. (eds). Springer, pp. 3-10.

Paolacci, A. R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E. y Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10: 1-27.

Puolimatka, M. y Pauk, J. (2000). Effect of induction duration and medium composition on plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Journal of Plant Physiology* 156:197-203.

Rohde, A., De Rycke, R., Beeckman, T., Engler, G., Van Montagu, M. y Boerjan, W. (2000). *ABI3* affects plastid differentiation in darkgrown *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 12:35–52.

Sánchez-Monge, E. (1974). Fitogenética: mejora de plantas. Monografías INIA Vol 12. Ministerio de Agricultura, Madrid.

Snape, J.W., Simpson, E. y Parker, B.B. (1986). Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. En *Genetic manipulation in plant breeding*, Horn, W., Jensen, C.J., Odenbach, W., Schieder, O. (eds). Walter de Gruyter, Berlin, pp. 217-229.

Soriano, M., (2008). Embriogénesis de la microspora en trigo panadero: optimización de la producción de plantas doblehaploides y estudio de la expresión de genes de estrés durante el pretratamiento. Tesis doctoral. Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), Zaragoza. Departamento de Genética y Producción Vegetal.

Stampacchia, O., Girard, J., Zanasco, J.L., Zerges, W., Bennoun, P. y David, J. (1997). A Nuclear-Encoded Function Essential for Translation of the Chloroplast *psaB* mRNA in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 9: 773-782.

Svensson, J.T., Crosatti, C., Campoll, C., Bassi, R., Stanca, A.M., Close, T. y Cattivelli, L. (2006). Transcriptome Analysis of Cold Acclimation in Barley Albina and Xantha Mutants. *Plant Physiology* 141: 257–270.

Szarejko, I. (2003). Doubled haploid mutant production. En *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster, B.P., Szarejko I. (eds). Kluwer, Dordrecht, pp. 351-361.

- Thomas, W.T.B., Forster, B.P. y Gertsson B. (2003). Doubled haploids in breeding. En Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual, Maluszynski, M., Kasha, K.J., Foster, B.P. y Szarejko, I. (eds). Kluwer, Dordrecht, pp. 337-349.
- Torp, A.M., Hansen, A.L. y Andersen, S.B. (2001). Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica* 119: 377-387.
- Touraev, A., Indrianto, I., Wratschko, O., Vicente, O. y Heberle-Bors E. (1996a). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* 9: 209-215.
- Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O. y Heberle-Bors, E. (1996b). Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Planta* 200:144-152.
- Turesson, I.K.D., Pedersen, S. y Andersen, S.B. (1989). Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 879-883.
- Wojnarowiez, G., Jacquard, C., Devaux, P., Sangwan, R.S. y Clément C. (2002). Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 162:843-847.
- Wojnarowiez, G., Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R. y Clément C. (2004). Barley anther culture: assesment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *Journal of Plant Physiology* 161: 747-755.
- Xiang, Y., Song, M., Wei, Z., Tong, J., Zhang L., Xiao, L., Ma, Z. y Wang, Y. , (2011). A jacalin-related lectin-like gene in wheat is a component of the plant defence system. *Journal of Experimental Botany*, vol 62,15: 5471–5483.
- Yu, F., Liu, X., Alsheikh, M., Park, S. y Rodermel, S., (2008). Mutations in SUPPRESSOR OF VARIATION1, a Factor Required for Normal Chloroplast Translation, Suppress *var2* Mediated Leaf Variegation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 20: 1786–1804.
- Zhang, H., Schelrer, D.C., Fowle, W.H. y Goodman, H.M. (1992). Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4:1575–1588.

Zhang, L., Wang, Y., Zhao, L., Shi, S. y Zhang L. (2006). Involvement of nitric oxide in light mediated greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology* 163:818—826.

Zorinants, S., Tashpulatov, A.S., Heberle-Bors, E. y Touraev, A. (2005). The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis. En: *Haploids in Crop Improvement II*, Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K.J. (eds). *Biotechnology in agriculture and forestry* 56: 35-52.

8.- ANEXO I

Metodología general del cultivo de anteras.

Las semillas de las líneas DHs y de las variedades de cebada utilizadas se sembraron en un “paper-pot” con un sustrato compuesto por arena, vermiculita y turba (1:1:1). Se vernalizaron en una cámara durante 4 semanas a 4°C, con un fotoperiodo de 8/16h luz/oscuridad, y $100\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa proporcionada por tubos fluorescentes (Mazdafluor 18W). Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas a macetas con el mismo sustrato y trasladadas a una cámara de crecimiento a 12°C, con un fotoperiodo de 12/12h luz/oscuridad, y $500\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa proporcionada por lámparas de halogenuro metálico de alta presión (Philips Powertone HPI-T Plus 400 W).

Después de 21 días, la temperatura se incrementó a 18-21°C y el fotoperiodo a 16/8h luz/oscuridad, hasta que las espigas fueron cosechadas (Figura 33). La humedad relativa para ambos periodos fue del 70-80%. En el momento de la preparación del sustrato, éste se fertilizó con una combinación de N:P:K (15:15:15). Además, la fertilización foliar “Zelti foliage” (Zeneca-Agro S.A) que contiene N:P:K (20:20:20) y micronutrientes se aplicó una vez por semana durante la fase de crecimiento.



Figura 33.- Plantas de cebada en cámara de crecimiento a 18-21°C y fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad.

El estado óptimo de desarrollo de las microsporas para el cultivo de anteras es de uninucleado medio a tardío. Para seleccionar las espigas en dicho estado se utilizó

el carácter morfológico: distancia entre las l gulas de la hoja bandera y la próxima hoja inferior.

Todo el procedimiento que se describe a continuación, se realizó con material de laboratorio esterilizado y en condiciones asépticas en una cámara de flujo horizontal. Y durante todo el procedimiento las placas que contenían material vegetal se mantuvieron selladas con papel del tipo Parafilm, entre una fase y otra.

Las espigas cosechadas envueltas en su vaina, se esterilizaron con etanol al 70%. Posteriormente se eliminó la vaina y se colocaron en placas Petri de 9cm  , que contenían una gota de agua. Las placas se almacenaron en una nevera a 4 C durante 2-3 días hasta su posterior uso.

Tratamiento de estrés

Las anteras fueron extraídas de la flor utilizando un microscopio estereoscópico y se inocularon en el medio de tratamiento de estrés. Las placas se incubaron en oscuridad a 24 C durante 4 días.

El medio de tratamiento de estrés en cebada (TEC) estaba compuesto por 0,7M manitol, 40mM CaCl₂ y 8g/l agarosa Sea Plaque (Lonza). El estrés aplicado a las anteras es de inanición y presión osmótica.

Inducción de embriogénesis.

Después de los 4 días de tratamiento de estrés, se seleccionaron las anteras que habían respondido y presentaban un aspecto hinchado y brillante (Figura 34.a). Estas se inocularon en placas Petri de 3cm   con el medio de inducción FHGI suplementado con 1mg/l de BA (6- bencilaminopurina) y 200g/l de Ficoll tipo 400. Las placas se incubaron a 24 C en oscuridad y después de 10 o 12 días de cultivo, se añadieron 2ml de medio FHGI con 400g/l de Ficoll tipo 400 (Kao y col. 1991) (Figura 34.b y c).

Regeneración de embriones

Después de 25 días de cultivo, los embriones de buena calidad (Figura 34.d) fueron transferidos a medio de regeneración FHGR en placas de Petri de 6cm   (Castillo y col. 2000, Maluszynski y col. 2003a). Las placas se incubaron a 24 C, en oscuridad durante los primeros 2 días. Posteriormente se transfirieron a la luz con un

fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad y una intensidad luminosa de $200\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, proporcionada por lámparas fluorescentes- incandescentes (Mazdafluor TF 58W/LJ 54-Philips 25W) y 70- 80% de humedad relativa, hasta la obtención de plántulas verdes o albinas (Figura 34.e).

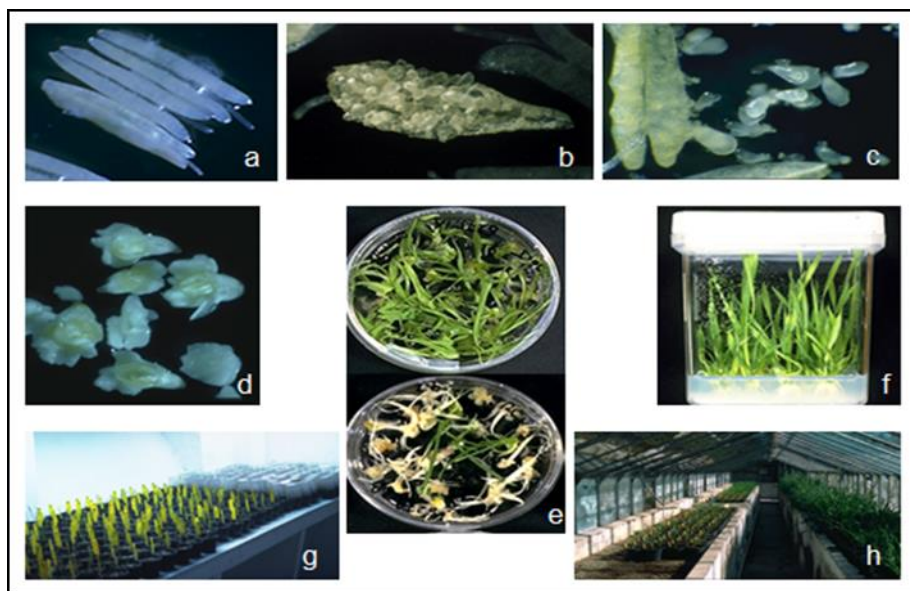


Figura 34.- Producción de plantas doblehaploides en cebada mediante el cultivo de anteras: a) Anteras sometidas a un tratamiento de estrés en un medio con manitol; b) Anteras en la fase de inducción, donde las microsporas empiezan a dividirse; c) Formación de estructura embriogénica; d) Embriones bien diferenciados; e) Plántulas verdes y albinas en el medio de regeneración; f) Plántulas verdes en una caja Magenta que contiene un medio para el desarrollo del sistema radicular; g) Trasplante a tierra y aclimatación de las plantas y h) Plantas en invernadero para obtención de semillas.

Crecimiento y vernalización de las plantas.

Todas las plántulas verdes regeneradas se transfirieron a unas cajas Magenta que contenían un medio pobre de sales, suplementado con 30g/l de sacarosa, 2mg/l de NAA, y 8g/l de agar, para el desarrollo de un buen sistema radicular (Figura 34.f).

Para la vernalización de las plantas, estas cajas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 4°C , 8/16h luz /oscuridad, y $100\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante un mes.

Traspaso de las plantas al suelo

Tras la vernalización, las plántulas se colocaron en una cámara de crecimiento a 16°C , 12/12h luz/oscuridad de fotoperiodo, con $200\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas incandescentes, fluorescentes y 90-100% HR.

Una semana más tarde, las plantas se traspasaron a macetas y se cubrieron con un vaso de plástico durante la primera semana para su aclimatación (Figura 34.g). Las plantas se mantienen en esta cámara durante otros 15 a 21 días más y se transfieren a invernaderos para su desarrollo y obtención de la semilla (Figura 34.h).

9.- ANEXO II

Expresión génica en hojas albinas y verdes de plantas obtenidas por cultivo de anteras en las variedades Vanessa, Siberia y Static.

Para realizar los análisis de expresión génica, se realizaron amplificaciones por PCR- Semicuantitativa. Para ello, se extrajo el RNA de las muestras de hojas y se sintetizó el cDNA. Con el cDNA se realizaron las amplificaciones, utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias de los genes seleccionados (Apartado 3.3.4.1, Tablas 8, 9, 10 y 11). Se empleó como gen control *Hv-Actin2*. Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa.

Los genes estudiados corresponden a las colecciones siguientes:

- (EM) Colección de genes inducidos en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora y que estaban asociados al componente celular plastídico
- (QTL-Alb) Colección de genes asociados a plastídios que han sido mapados en regiones cromosómicas donde se había localizado algún QTLs de albinismo en cultivo de anteras.
- (M-Alb) Colección de genes que permitían diferenciar entre distintos tipos de mutantes albinos de cebada.

- Análisis de la colección EM

De los 30 genes que componían esta colección, los genes *SRS*, *PK1B*, *CRS1* y *Hv-ALB2* no amplificaron en las muestras de hojas. Según los resultados obtenidos mostrados en la figura 35, se seleccionaron los genes *RRF*, *NOS1*, *RLUB*, *RHB1A*, *DAG*, *SBE*, *TAB*, *RPL28* y *SIG* para continuar con los estudios.

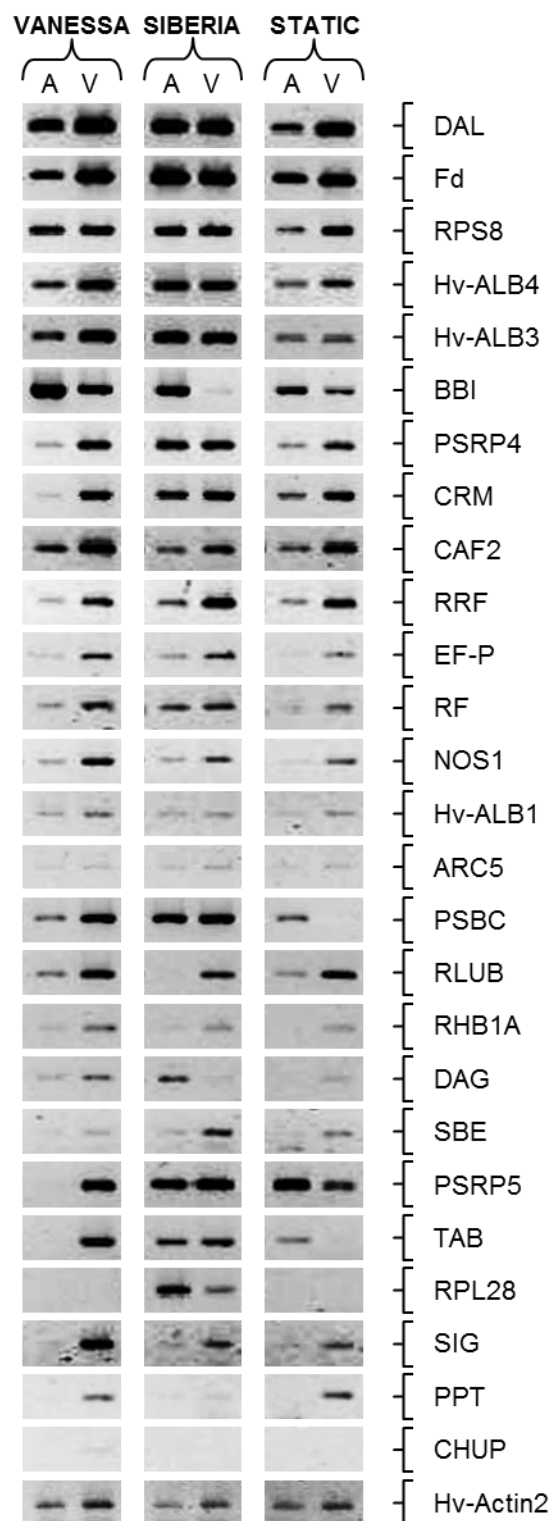


Figura 35.- Análisis de expresión de 26 de los genes de la colección EM mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hoja albinas (A) y hojas verdes (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*.

- Análisis de la colección QTL-Alb.

De los 17 genes que componían esta colección, los genes CAX y BAG no amplificaron en las muestras de hojas. Según los resultados obtenidos mostrados en la figura 36, solo se seleccionó el gen *Hv-ALB5* para continuar con los estudios.

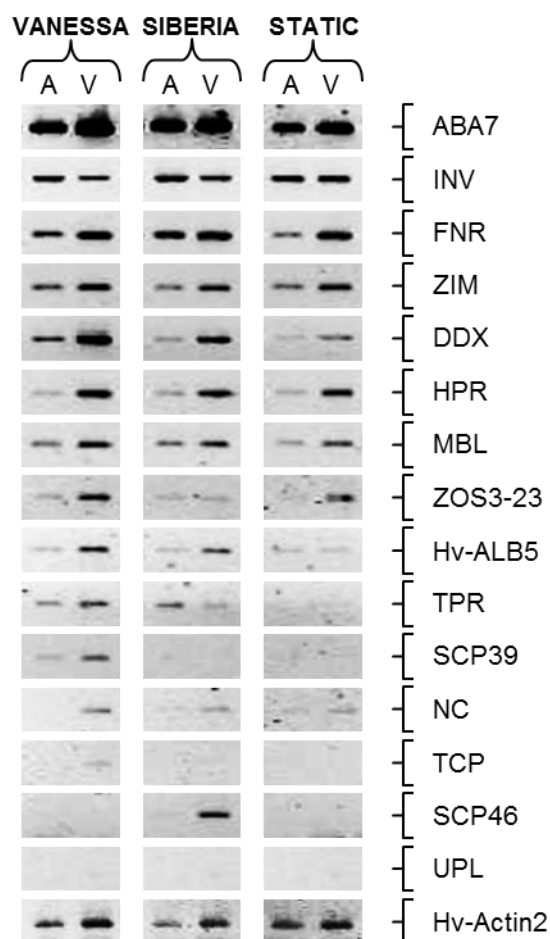


Figura 36.- Análisis de expresión de los 15 genes de la colección QTL-Alb mediante PCR-Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hoja albina (A) y hoja verde (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*.

- Análisis de la colección M-Alb

De los 20 genes que componían esta colección, los genes FRO y COR14b no amplificaron en las muestras de hojas. Según los resultados obtenidos mostrados en la Figura 37, se seleccionaron los genes *JRL*, *PSAN*, *RNS*, *WCAB-2* y *WCAB-1* para continuar con los estudios.

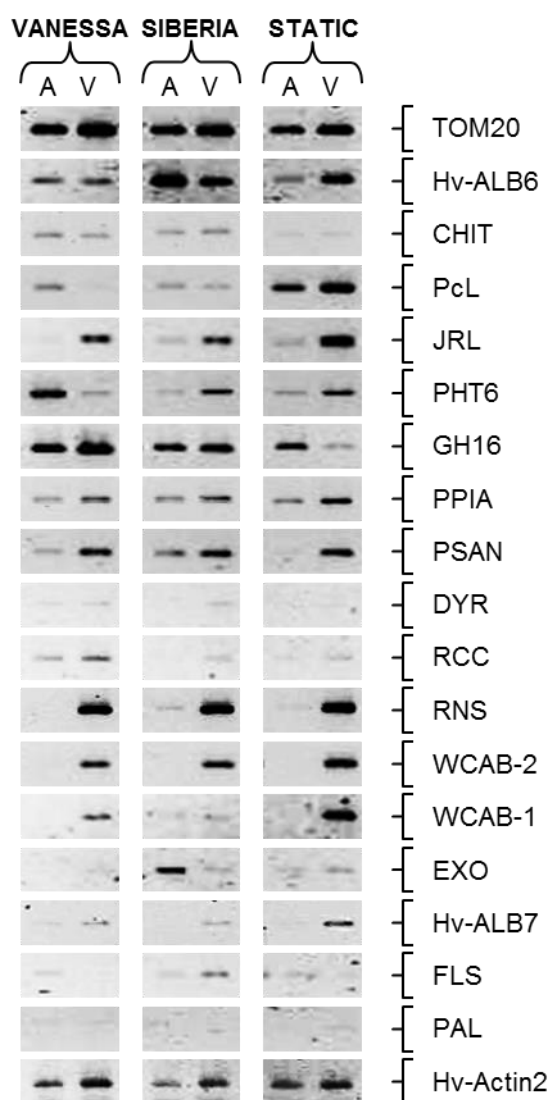


Figura 37.- Análisis de expresión de los 18 genes M-Alb mediante PCR- Semicuantitativa y gel de agarosa, en muestras de hoja albina (A) y hoja verde (V) de las variedades de cebada Vanessa, Siberia y Static. Se empleó como gen constitutivo *Hv-Actin2*.